

Année scolaire 1968-1969

Les Biostimulines
Isolement et caractérisation des différents composants
du complexe biogène végétal

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 17 février 1969

devant la Faculté de Pharmacie de Nancy

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : Pharmacie)

par

Hermann LANGER

Pharmacien MR

Jury : Monsieur le Professeur J.-G. MARCHAL, Président
Monsieur le Professeur SOLEIL
Monsieur le Professeur STEIMETZ } Juges

IMPRIMERIE FABRÈGUE
SAINT-YRIEIX

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Année scolaire 1968-1969

Les Biostimulines
Isolement et caractérisation des différents composants
du complexe biogène végétal

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 17 février 1969

devant la Faculté de Pharmacie de Nancy

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : Pharmacie)

par

Hermann LANGER

Pharmacien MR

Jury : Monsieur le Professeur J.-G. MARCHAL, Président
Monsieur le Professeur SOLEIL
Monsieur le Professeur STEIMETZ } Juges

IMPRIMERIE FABRÈGUE
SAINT-YRIEIX

1969



FACULTÉ DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE NANCY

ADMINISTRATION

Doyen

Professeur A. BERNANOSE

Assesseur

Professeur R. BENE

Secrétaire principal

B. SEUROT

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
M ^{lle}	FRANÇOIS M.-Th.	Matière médicale
MM.	MARCHAL J.-G.	Microbiologie
	STEIMETZ	Sciences naturelles
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
M ^{lle}	BESSON	Pharmacodynamie
MM.	BENE R.	Sciences biologiques
	MIRJOLET M.	Chimie analytique et toxicologie
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	PELT J.-M.	Biologie végétale et cryptogamie

Maître de conférences agrégé

M.	MARTIN J.-A.	Chimie minérale
----	-------------------	-----------------

Maîtres de conférences délégués

M ^{lle}	GIRARD	Hygiène
MM.	HAYON	Matière médicale et botanique
	JOUANY	Toxicologie
	SCHWATZBROD	Microbiologie
	SIEST	Chimie biologique

Chargés de cours complémentaires

M.	MEUNIER A.	Hydrologie ; notions de pharmacie galénique de législation pharmaceutique et d'orientation professionnelle
----	-----------------	--

N...	Parasitologie
MM. MARCHAL J.-G.	C. E. S. immunologie
STEIMETZ	Mycologie ; minéralogie
SOLEIL J.	Chimie organique
BERNANOSE A.	Optique et acoustique ; physi- que biologique
M ^{lle} BESSON	Application thérapeutique de la pharmacodynamie
MM. BENE R.	Zoologie ; biologie
LAGARDE (Fac. Droit)	Déontologie et législation phar- maceutique
PIERFITTE M.	C. E. S. chimie biologique
PELT J.-M.	Botanique générale
MARTIN J.-A.	Travaux dirigés de chimie gén- érale et minérale
BOYER P.	Notions de mathématiques appli- quées aux sciences expériment- ales ; physique
M ^{lle} GIRARD Th.	Travaux dirigés de zoologie bio- logie
MM. LOPPINET V.	Chimie organique
DIXNEUF P.	Travaux dirigés de physique
BARTHELEMY J.	Travaux dirigés de mathémati- ques
HOFFMAN M.	Travaux dirigés de pharmacie galénique

Chefs de Travaux

M ^{me} LASSEUR A.	Microbiologie
MM. AIMOND P.	Chimie analytique quantitative
LOPPINET V.	Travaux pratiques de pharmaco- technie chimique
M ^{me} BALDO S.	Travaux pratiques de microbio- logie
MM. BAUDOT Ph. (délégué)	Chimie analytique qualitative
DIXNEUF P.	Physique
JACQUE M.	Pharmacodynamie
M ^{me} BROCHET	Travaux pratiques de pharmacie
M. HOFFMAN M. (délégué)	Pharmacie galénique
M ^{lle} BARRET F.	Zoologie
M. LEOTARD P.	Micrographie
M ^{lle} ROOS F.	Biochimie
M ^{lle} PANEK E.	Chimie biologique
<i>Doyen honoraire</i>	M. RICHARD, Recteur de l'aca- démie de Toulouse

<i>Professeur honoraire</i>	M. CORDEBARD H. M. FRANQUET R.
-----------------------------	-----------------------------------

<i>Maitre de Conférences honoraire</i>	M. ANZIANI P.
--	---------------

Au Président du jury de ma thèse,

Monsieur J.-G. MARCHAL
*Professeur de microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

A mes Juges,

Monsieur J. SOLEIL
*Professeur de pharmacie chimique
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

Monsieur E. STEIMETZ
*Professeur de sciences naturelles
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

Hommage de sincère gratitude.

A ma Femme,

A ma Mère,

A Madame et Monsieur SCOTONI, Docteur en pharmacie,

Faible témoignage de mon affection
et de ma reconnaissance.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la microbiologie et la chimie biologique s'intéressent à des recherches sur des produits naturels ou synthétiques possédant, à des doses infinitésimales, une nette action stimulante sur des micro-organismes et dont la carence occasionne des troubles métaboliques qui se manifestent surtout par un ralentissement et un affaiblissement de la croissance.

Ces recherches ont fait faire un grand pas en avant à nos connaissances sur les vitamines, les coenzymes et les acides aminés, dont certains de ces derniers sont reconnus comme facteurs indispensables chez les organismes supérieurs.

L'étude des Biostimulines des micro-organismes a largement contribué au développement de nos connaissances sur les vitamines. D'après DELAUNOY (Concours Médical, 1952), on peut définir ces facteurs de la façon suivante : « *Les tissus d'origine animale ou végétale, séparés de l'organisme et soumis à des basses températures, acquièrent de nouvelles potentialités biologiques. Ils développent des substances de nature encore inconnue, mais douées d'un remarquable pouvoir stimulant sur les processus de défense et de régénération de l'organisme* ».

Ainsi, des micro-organismes constituent actuellement les meilleurs tests pour déceler et doser des facteurs de croissance naturels ou synthétiques pouvant être rangés dans le grand groupe des vitamines ; ce terme étant considéré dans son sens le plus large.

Le rôle éminent de ces micro-organismes dans la découverte de nouveaux facteurs de croissance ressort d'exemples connus : l'acide folique, le groupe des vitamines B 6 et B 12, la streptogénine, etc. La mise en évidence de leur action biologique a prouvé l'existence de relations étroites entre les vitamines proprement dites et les acides aminés.

Les recherches expérimentales les plus récentes ont indubitablement prouvé que les amino-acides constituent des métabolites aussi importants que les vitamines, les ferments et les hormones. De plus, on connaît actuellement la fonction biologique de certaines *Biostimulines*, leur relation avec des systèmes enzymatiques donnés. Ces faits, étudiés chez les micro-organismes, ont permis de se faire une opinion sur leur action chez les organismes supérieurs et ont eu une importance très grande sur le plan médical.

L'étude des problèmes posés par les Biostimulines a également permis de démontrer que ces facteurs de croissance microbiens sont en compétition avec des inhibiteurs de croissance, et il faut reconnaître qu'il existe, dans les processus biologiques, une interaction importante entre les stimulines et leurs antagonistes naturels.

Si l'on connaît aujourd'hui l'importance des facteurs stimulants ou inhibiteurs de croissance, de nombreuses questions restées encore sans réponse prouvent que l'on ne peut pas orienter les recherches dans l'une ou l'autre direction seulement, mais que l'on doit s'attaquer à un ensemble de problèmes complexes, tributaires les uns des autres.

Le terme de « *facteur de croissance* », somme toute très vague, est entré dans le langage courant des botanistes, des microbiologistes, des physiologues, etc. ; il désigne des biocatalyseurs activant ou régularisant les processus physiologiques et métaboliques aussi bien animaux que végétaux. Suivant leur origine et suivant le terrain biologique sur lequel agissent ces biocatalyseurs, ils se rapprochent ou font partie des vitamines, des hormones animales, des phytohormones, des acides aminés, des ferments et des Biostimulines. Comme on le voit, les facteurs de croissance ne jouent pas seulement un rôle en microbiologie, mais interviennent d'une façon aussi manifeste chez tous les organismes vivants dans leur ensemble.

En ce qui concerne les produits antagonistes que nous trouvons dans la nature, il faut distinguer entre les antibiotiques proprement dits et les substances inhibitrices que l'école russe a désignées par le terme de « *phytoncides* ». Il s'agit là de produits bactéricides, protistocides et fongicides qui ont une certaine action protectrice sur les végétaux qui les élaborent. On voit que le terme de « *phytoncide* » a une signification beaucoup plus large que celui d'« *antibiotique* ». En effet, le mot antibiose dérive du grec « *antibios* » et a été choisi par opposition à celui de symbiose. Il désignait initialement l'antagonisme biologique qui existe entre certains micro-organismes vivants. L'antibiose est le contraire de la symbiose, elle résulte d'une concurrence entre deux organismes, l'un produisant une ou plusieurs substances spécifiques, dites « *antibiotiques* », qui rendent tout voisinage intolérable à l'autre. A l'origine, les phénomènes d'antibiose se concevaient principalement pour les végétaux microscopiques, mais au cours des dernières années et depuis l'ère de la Pénicilline, la définition du terme antibiotique s'est élargie et son domaine ne se limite plus uniquement aux êtres inférieurs, bactéries et champignons. Les plantes supérieures élaborent également des principes antimicrobiens qui, souvent, ne sont pas moins actifs ou moins spécifiques que la Pénicilline, la Streptomycine, l'Auréomycine, etc. Ainsi, nous savons depuis fort longtemps que les plantes supérieures peuvent également se protéger contre les organismes nuisibles par la production de substances dont on discute la spécificité, mais qui inhibent la croissance de ces agents pathogènes.

Il est donc possible que des substances phytoncides produites par les plantes supérieures, ou des antibiotiques excrétés par des micro-organismes agissent en stimulant le pouvoir protecteur des tissus de l'homme ou de

l'animal malade. Cette action ne serait par conséquent pas antibiotique, mais au contraire « biotique ».

Le but de notre travail était d'étudier la constitution des Biostimulines végétales et, d'autre part, de contrôler leur action métabolique.

La découverte des propriétés allométatrophiques des Lactobacilles et du *Zymomonas mobile* permet d'entreprendre de telles recherches.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous ne voudrions pas manquer d'exprimer ici notre reconnaissance à M. J.-G. MARCHAL, Professeur de microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy. Il nous a aimablement accueilli dans son laboratoire, où nous avons fait de longs séjours, et nous fait aujourd'hui le grand honneur de présider notre jury de thèse.

Nos remerciements vont également à M. J. SOLEIL, Professeur de pharmacie chimique à la Faculté de Pharmacie de Nancy, et à M. E. STEIMETZ, Professeur de sciences naturelles à la Faculté de Pharmacie de Nancy, pour la gentillesse avec laquelle ils ont bien voulu accepter de siéger dans ce jury.

M. J. MEYER, ancien Maître de conférences d'hygiène et de microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, a droit à notre gratitude toute particulière. En effet, instigateur de ce travail, il nous a encouragé et soutenu au cours de son élaboration, nous aidant dans la mesure du possible à atteindre le but que nous nous étions fixé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

BIOSTIMULINES ET EXTRAITS PLACENTAIRES

Dans son travail précurseur sur les Biostimulines d'origine végétale, FAUDI (1957) a classé les facteurs de croissance dans deux grands groupes : les biocatalyseurs à action générale et les biocatalyseurs à action sélective. Dans le premier groupe, il range en particulier les différentes vitamines et des coenzymes plus ou moins en rapport avec celles-ci ; dans le deuxième groupe, il cite une hormone de régénération tissulaire, activant la multiplication et la division cellulaire au niveau des plaies et des traumatismes, puis l'Histidine, activateur de la circulation plasmatique, les substances issues des glandes à sécrétion interne et les hormones gonadotropes.

Comme catalyseur végétal, il faut mentionner l'*auxine* α et β , ainsi que l'*hétérauxine*, qui sont des agents de la régulation de la croissance des plantes. D'autre part, on trouve dans ce groupe l'acide folique, la vitamine B 12, la streptogénine et quelques autres facteurs d'origine animale ou végétale, ces derniers étant surtout produits par des Moisissures.

FAUDI range également dans ce deuxième groupe des Biostimulines découvertes par FILATOV en 1933. Cet auteur a constaté qu'un greffon de cornée conservé en glacière pendant plusieurs jours, non seulement prenait aussi bien qu'un greffon fraîchement prélevé, mais encore déterminait autour de lui un éclaircissement de la cornée malade et parfois même, dans les cas les plus favorables, provoquait l'éclaircissement de la cornée de l'autre œil malade non traité par une greffe.

En se basant sur cette découverte GATE et VACHIER (1) ont établi que :

1° Dans un tissu vivant, placé dans des conditions de milieu défavorable, on voit apparaître au cours de sa lutte pour la vie des substances de résistance, les stimulines biogènes, qui ne semblent pas spécifiques des tissus en souffrance ;

2° Les stimulines biogènes introduites dans un organisme quelconque par implantation, injection d'extraits, etc., activent les processus vitaux de cet organisme, augmentent ses capacités de réaction aux agents agressifs de toute nature et stimulent ses possibilités de guérison. L'universalité d'origine et d'action sont les deux principes fondamentaux de la thérapie tissulaire.

On voit ainsi que les bases de la thérapie de FILATOV résident dans le fait que des tissus vivants animaux ou végétaux exposés à des conditions défavorables, mais non mortelles pour eux, élaborent des substances biologiquement très actives. Ces facteurs biogènes devraient stimuler les moyens de défense de l'organisme malade et ainsi contribuer à la guérison. Les conditions de milieu favorables à la production de Biostimulines sont variables : ainsi, elles consisteraient pour les tissus animaux en l'exposition au froid (+ 3° à + 4°) et pour les tissus végétaux, à l'obscurité ou à des rayonnements UV, X, etc. Ce sont donc des phénomènes de « stress » qui déclenchent la production de Biostimulines.

En partant de ces premières expériences sur les maladies oculaires, FILATOV les a ensuite étendues à la médecine générale. Il avait obtenu des résultats très favorables, particulièrement dans la rétinite pigmentaire, affection inguérissable jusqu'alors. A la suite de ce succès, un grand nombre d'auteurs ont eu recours à cette thérapie tissulaire en ophtalmologie, à partir de 1946 et 1947. Les méthodes employées étaient l'implantation sub-conjonctivale de tissu placentaire ou l'injection sub-conjonctivale, sous-cutanée ou intramusculaire d'extraits placentaires.

Depuis lors, bien des travaux ont été publiés, dont les conclusions sont assez discordantes : à côté de succès éclatants, on rapporte des échecs complets. La théorie de FILATOV semble encore aléatoire, car on n'a pas su, jusqu'à présent, caractériser la structure chimique de ces Biostimulines. De nombreux auteurs ont obtenu des résultats cliniques aussi valables et même meilleurs en procédant à l'implantation de tissus frais. Dans ces conditions, les Biostimulines ne peuvent pas jouer de rôle, puisque leur formation s'effectue uniquement par exposition des tissus à des conditions défavorables : l'on pourrait penser cependant que l'implantation détermine une action vaso-dilatatrice ou hormonale, car BOROS (2) a pu déceler une action pseudo-histaminique de l'extrait placentaire de FILATOV sur l'intestin de cobaye. MOGINIER (3), effectuant des expériences comparatives avec des implants placentaires et de l'acide nicotinique, a émis l'opinion que les deux traitements donnaient des résultats comparables, grâce à leur propriété vaso-dilatatrice. BISCHOFF (4) recommande la thérapie tissulaire de FILATOV pour traiter les maladies réfractaires aux autres traitements.

Propriétés biologiques des extraits placentaires de Filatov

Comme nous l'avons déjà mentionné, la constitution chimique des Biostimulines est encore inconnue. On a voulu attribuer leurs propriétés biologiques à certains de leurs constituants : des polypeptides, des acides gras en général ou des acides gras essentiels, des combinaisons à liaison sulfhydryle, des acides nucléiques indéterminés, etc. Il est probable qu'il ne s'agit ni de protéines, ni d'enzymes proprement dits. D'après FILATOV, ces stimulines doivent apparaître au cours du métabolisme biochimique des protéines plasmatiques. Il faut remarquer que des Biostimulines ont été isolées à partir de racines et de feuilles d'Aloès placées dans des conditions adéquates. Ayant pu constater une augmentation de l'acidité des préparations d'Aloès conservées à l'obscurité, FILATOV en déduit que les Biostimulines pourraient être des acides, en particulier des acides dicarboniques ou des complexes de ces acides.

En ce qui concerne le mode d'action de ces Biostimulines, FILATOV a fait l'expérience suivante : il mélange des extraits de feuilles d'Aloès préalablement chauffés à 120 °C avec des ferments dont le pouvoir protéolytique est détruit, et constate que les propriétés enzymatiques réapparaissent ; si l'on met l'extrait végétal en présence de ferment protéolytique actif, cette activité est augmentée. FILATOV croit pouvoir en conclure que les Biostimulines agissent en activant les propriétés enzymatiques de l'organisme et en régénérant des enzymes déficients.

Les résultats thérapeutiques et expérimentaux éclairent d'un jour nouveau certains problèmes de pathologie, de biologie et de thérapeutique, et ceci malgré certains insuccès. On a ainsi eu recours à la thérapie des Biostimulines dans certaines maladies dermatologiques, dans l'ophtalmologie, dans la tuberculose, dans des ulcères gastriques, etc.

BOROS a tenté en 1951 de déterminer les propriétés biologiques des extraits préparés selon la technique de FILATOV ; il voulait savoir en particulier si les produits notoirement actifs des extraits placentaires, tels que l'Histamine, l'Acétylcholine, etc. subsistaient après exposition d'une heure à l'autoclave à 120 °C. On pouvait en effet se demander si ces extraits ne contenaient pas des vaso-dilatateurs qui occasionnent une meilleure diffusion dans le tissu pathologique, responsable de la guérison ou qui exercent une action stimulante sur les médicaments. Cette question peut se justifier, puisque l'extrait placentaire préparé d'après les données de FILATOV constitue une solution hypotonique à réaction acide qui peut déclencher dans les tissus, soit directement soit par axone-réflexe, la libération d'Histamine. Il faut encore noter que par suite de l'autolyse « *post-mortem* » des tissus implantés, une grande quantité d'Acétylcholine peut être libérée et que, de plus, les bactéries peuvent dégrader des protéines, formant ainsi des amino-acides et en particulier de l'Histamine. Les germes infectieux n'ont pas de prise sur l'Acétylcholine qui est rapidement dégradée par les acides et subit ainsi, après très peu de temps, une hydrolyse accélérée encore par sa thermolabilité.

Il faut par contre attribuer un rôle important à l'Histamine, puisqu'elle est très thermostable et se trouve en quantité appréciable encore après plusieurs heures d'ébullition en milieu acide.

BOROS a encore admis que les extraits de FILATOV contiennent un excès d'ions Calcium, et c'est pour cette raison qu'il a comparé l'activité thérapeutique des extraits avec celle des ions Calcium. Le dosage a montré que 100 ml d'extrait placentaire contiennent en moyenne 2,2 mg de calcium et 2,6 mg de potassium. Cependant, les cendres de 100 ml d'extrait, reprises dans 100 ml de solution de Ringer et employées à la dose thérapeutiquement active des extraits naturels, n'avaient aucune action. Bien que le taux en calcium joue un certain rôle dans l'activité des extraits placentaires, cette dernière n'est pas comparable à l'action du calcium seul. En principe, on pensait pouvoir déduire de ces données que les extraits placentaires de FILATOV agissent par la libération « *in situ* » d'une certaine quantité d'Histamine.

MEYER, BURLET et FAUDI avaient essayé de doser l'activité biogène de divers extraits de plantes supérieures (maïs, tomate, etc.) au moyen de tigelles de graines de Maïs, de *Pisum sativum* et de *Lepidium sativum*. Ils ont également contrôlé la capacité de divers micro-organismes pour servir de germes-test dans ces expériences (*Staphylococcus aureus*, *Proteus* X-19, *Escherichia coli* et *Zymomonas mobile* Lindner). Ils ont ainsi pu constater que ce dernier germe se prêtait le mieux à ces dosages.

Dosage des Biostimulines

Bactérie-test utilisée dans ce but : *Zymomonas mobile* Lindner

Zymomonas mobile a été isolé en 1925 à partir de jus d'Agave par Lindner (5) qui l'a désigné par le nom de *Termobacterium mobile*. En Hollande, ce germe est utilisé dans l'industrie brassicole. Au point de vue morphologie, *Zymomonas mobile* Lindner est un diplobacille mobile, le plus souvent étranglé vers sa partie médiane. Il mesure 4 à 5 μ sur 1,4 à 2 μ ; il s'agit d'une bactérie Gram-négative, asporulée, munie d'une touffe de cils polaires. Il a besoin, pour son développement, de glucose et de lévulose ; il ne dégrade pas le mannose, le galactose, le maltose, le lactose, le raffinose, l'arabinose, le mannitol, la dextrine. Il lui faut également un biocatalyseur qui se trouve en grande quantité dans le moût de bière.

Zymomonas est une bactérie très fragile, sa vitalité est assez restreinte, il se maintient en culture pendant trois semaines environ et si le glucose ou les autres oses assimilables sont épuisés, il succombe encore plus rapidement. Une des propriétés les plus caractéristiques de *Zymomonas mobile* est d'utiliser complètement les sucres assimilables, en libérant une très grande quantité de gaz carbonique. Le processus chimique dû à ce phénomène modifie grandement le pH du milieu.

GIBBS et DEMOSS (6), ainsi que NICOL (7) ont fait des études à ce sujet ; on sait en effet que la formation d'éthanol s'effectue pendant la fermentation hétérolactique du glucose par *Leuconostoc mesenteroides*, par des stades différents du processus de glucolyse d'*Emden-Meyerhof-Parnas*. L'éthanol de la fermentation du type Levure (E. M. P.) est dérivé des atomes de carbone 1 et 6, alors que dans la fermentation hétérolactique seuls les carbones 2 et 3 donnent l'éthanol, le méthyle représentant le carbone neutre.

Il était donc intéressant de savoir si d'autres fermentations bactériennes étaient du type E.M.P. ou d'un autre type : Les auteurs ont choisi *Zymomonas mobile Lindner* comme bactérie-test à cause de son grand rendement en éthanol. Leur travail a montré que le processus de formation d'éthanol diffère de celui du type E.M.P. et également de celui d'hexose-monophosphate des bactéries hétérolactiques. Le mécanisme enzymatique se rapproche de celui de *Pseudomonas saccharophila* étudié par ENTNER et DOUDOROFF (8).

GIBBS et DEMOSS ont effectué leurs recherches en employant comme isotope le ^{14}C . Ils ont constaté que *Zymomonas mobile Lindner* dégrade le glucose en fermentation anaérobie, en produisant à partir d'une molécule de glucose 1,8 mol. de CO_2 , 1,9 mol. d'éthanol et une trace d'acide lactique. La répartition du ^{14}C dans les produits de la fermentation a été recherchée au moyen de glucose 1- ^{14}C , 2- ^{14}C , 3,4- ^{14}C , 6- ^{14}C et de lévulose 1,6- ^{14}C . Les auteurs ont ainsi pu constater que :

- 1° Le CO_2 provient du carbone 1 et 4 du glucose ;
- 2° Les carbones 2, 3, 5 et 6 du glucose passent dans l'éthanol. Les carbones 2 et 5 forment les carbonates ;
- 3° Le lévulose et le glucose sont fermentés d'après le même schéma, car le lévulose 1,6- ^{14}C donne du $^{14}\text{CO}_2$ et de l'éthanol marqué en méthyle qui sont semblables à ceux trouvés avec le glucose 1- ^{14}C et le glucose 6- ^{14}C ;
- 4° La transformation du glucose en CO_2 et éthanol par le *Zymomonas mobile* suit un processus différent, du moins en partie, de celui connu pour le type E.M.P. et de celui du type hexose-monophosphate réalisé par *Leuconostoc mesenteroides*. La disposition des atomes marqués semble indiquer qu'il se produit un processus de dégradation semblable à celui de l'hydrolyse du glucose par *Pseudomonas saccharophila*.

Ces travaux montrent donc les caractéristiques différentielles très nettes du pouvoir enzymatique de *Zymomonas mobile* et permettent d'expliquer la forte production d'alcool de cet organisme à partir des hexoses.

Ce germe est très thermosensible et ne résiste pas à des températures dépassant 30 °C. L'optimum de culture se trouve entre 18 °C et 27 °C ; les températures trop basses arrêtent le développement. Lors de ses essais, ILLIEN (9) a cultivé *Zymomonas mobile Lindner* sur un milieu au moût de bière non houblonné, à 4 % de glucose. Il s'agit d'un substrat liquide

et le repiquage est effectué tous les 15 jours au moins. Nous reviendrons sur ces techniques de culture au cours de nos travaux personnels.

Cette bactérie n'évolue guère sur les milieux peptonés ou protidiques ; son développement est possible en milieu liquide ou solide à base de peptone, d'extrait de levure ou de moût de bière additionné de 2 à 10 % de glucose et initialement ajusté à $\text{pH} = 6,5$. Un pH plus alcalin empêche sa croissance.

Pour mettre en évidence les cils polaires de *Zymomonas mobile* Lindner et éviter leur disposition, ILLIEN a eu recours à la méthode de ZETTNOW (10) modifiée par ROMOND et ses collaborateurs.

En dehors des glucides, *Zymomonas mobile* Lindner a d'autres exigences particulières, comme nous l'avons déjà vu, vis-à-vis des substances protidiques. Il se développe dans le lait avec production d'une très légère acidité, mais sans entraîner la coagulation. Il ne liquéfie ni le sérum coagulé, ni la gélatine, ni le blanc d'œuf coagulé. Il ne produit pas d'indole, mais réduit les nitrates et le rouge neutre ; il ne produit pas d'anhydride sulfureux.

En résumé, *Zymomonas mobile* Lindner est un organisme assez exigeant, nécessitant la présence de glucose ou de lévulose dans le substrat nutritif et des produits protéidiques animaux ou végétaux plus ou moins dégradés.

Pour évaluer quantitativement la croissance de *Zymomonas mobile*, en rapport avec le taux de Biostimulines introduites dans le milieu, nous avons eu recours à la biophotométrie à l'aide de l'appareil de BONET-MAURY de JOUAN, et à la gazométrie par le tube de Besson.

Mesures biophotométriques

Description de l'appareil Bonet-Maury

Cet appareil travaille automatiquement et se compose des pièces suivantes :

Un photomètre placé dans une enceinte thermostatique contrôlée par un régulateur de température bimétallique à cadran et un voyant lumineux réglant la température ambiante jusqu'à 45°C . La précision du réglage est de l'ordre de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Le faisceau lumineux correspondant à chaque fiole peut être diaphragmé. Chaque diaphragme est indépendant et commandé par un disque moleté. Pour travailler dans les intervalles de longueur d'onde donnés, des filtres peuvent être interposés devant la fiole dans des emplacements spécialement prévus. En cas de solution peu colorée, les filtres neutres peuvent être interposés entre fiole et cellule pour diminuer l'intensité du flux lumineux. Toute une gamme de fioles d'épaisseurs différentes est prévue, depuis la fiole standard de 30 mm pour milieu peu absorbant, jusqu'à la fiole de 5 mm

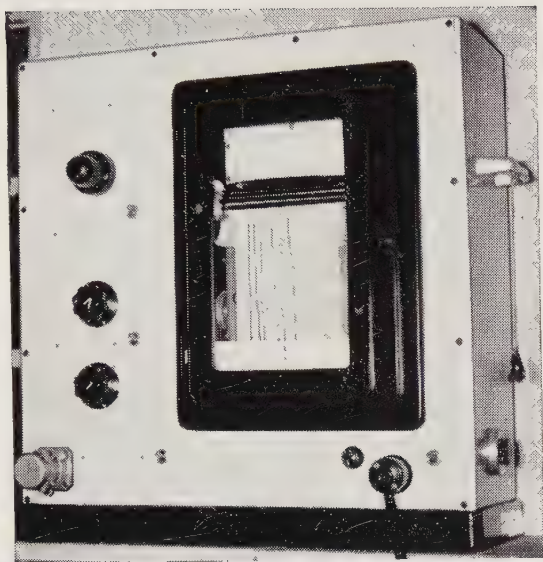


Fig. n° 1. — Appareil enregistreur de BONET-MAURY

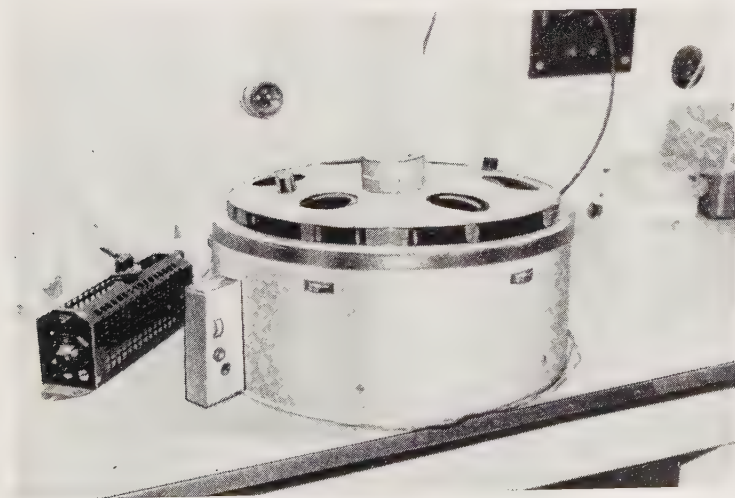


Fig. n° 2. — Enceinte thermostable

pour milieu allant jusqu'à une densité optique élevée, de l'ordre de 1,5 à 2,0.

Six fioles, se déplaçant automatiquement toutes les vingt secondes. Chaque fiole est constituée par un cylindre de verre Pyrex horizontal, limité par deux faces optiquement planes, parallèles et soudées. Leur capacité utile reste constante, elle est d'environ 10 ml pour les fioles standard. La surface du liquide peut rester en contact avec l'air par l'intermédiaire de la tubulure verticale de remplissage ou de vidange.

A l'intérieur de chaque fiole se trouve soit un barreau métallique enrobé de verre Pyrex, soit une bille métallique spécialement protégée, animée magnétiquement d'un mouvement de va-et-vient à vitesse et intensité réglable.

Un enregistreur : le galvanomètre enregistre automatiquement et successivement toutes les 20 secondes des points qui déterminent six courbes correspondant aux six faisceaux émis par la même lampe. La courbe correspondant à chaque faisceau traduit le pourcentage de transmission, la variation d'opacité du liquide à mesurer placé dans la fiole correspondante, au fur et à mesure de la croissance. Le dispositif enregistreur est encastré dans le panneau de commande de la boîte d'alimentation. La vitesse de déroulement du papier enregistreur est constante et peut être réglée aisément à deux vitesses différentes (20 et 60 mm par heure).

Une alimentation électrique : l'alimentation stabilisée sur un secteur alternatif de 50 périodes compense les variations de tension de fréquence et amène ainsi la stabilité absolue dans le temps. La boîte d'alimentation est reliée à l'enceinte thermostatée par un câble multiple, souple, sous gaine de protection plastique.

Nous donnons ci-devant deux photographies illustrant les deux pièces essentielles de l'appareil :

Mode d'emploi

On fixe le tableau d'enregistrement verticalement à un mur et l'enceinte thermostatée sur un support stable et horizontal. On place l'enceinte thermostatée à gauche du tableau d'enregistrement. On enfonce la prise dans la position donnée par son ergot sur son embase et on visse à fond le collier à ailettes. Avant de relier l'appareil au secteur, on vérifie si les interrupteurs sont bien dans la position levée. A ce moment, on nettoie soigneusement l'extérieur du boîtier de l'enregistreur, afin qu'aucune poussière ne puisse pénétrer dans l'appareil en ouvrant ce boîtier. L'enregistreur est ouvert à l'aide de la clé à canon triangulaire. L'opération suivante doit être effectuée lentement, car une manœuvre brusque du levier de verrouillage risquerait de détériorer les pivots du système mobile. Le levier de verrouillage placé sur la droite du châssis est abaissé lentement, ce qui a pour effet de libérer l'aiguille du système de mesure, de fermer le contact d'alimentation du moteur synchrone, de verrouiller le châssis mobile porte-diagramme.

L'aiguille du galvanomètre étant ainsi libérée, on règle le zéro mécanique de l'appareil en déplaçant doucement le levier rouge situé au-dessus du cadran, soit vers la droite, soit vers la gauche. L'enregistreur une fois fermé, est prêt à fonctionner.

On enfonce la prise suivant un ergot repéré par un point blanc dans son embase et on branche l'autre extrémité du cordon sur la prise de secteur. Il est recommandé de raccorder la vis à écrou moleté à une bonne prise de terre. L'interrupteur général est alors abaissé, la lampe doit s'allumer. La mise en marche du chauffage régulé s'effectue par abaissement de l'interrupteur, un voyant s'allume qui indique que la tension est aux bornes du système de chauffage.

Pour le réglage de la température, on disposera tout d'abord le thermomètre à la place prévue, on dévisse le bouton A gradué du régulateur de quelques tours dans le sens « + ». Le voyant B s'allume. Lorsque la température indiquée par le thermomètre est inférieure de 2 °C à celle désirée, tourner le bouton A dans le sens « — » jusqu'à l'extinction du voyant B. Il faudra prendre soin de ne pas dépasser ce point, car le régulateur étant très sensible, une petite déviation du bouton gradué entraîne une variation importante de la température. Après une dizaine de minutes, nécessaires pour que la température se stabilise, on la corrige s'il y a lieu à l'aide du bouton moleté et en tenant compte du fait que la distance séparant deux chiffres gravés représente sensiblement 6 °C. Pour une même position du bouton, on obtiendra toujours la même température. Cependant, pour tenir compte de la légère usure des contacts dans le régulateur, il faudrait vérifier le réglage de temps en temps.

Il peut arriver que la température indiquée par le thermomètre et celle du liquide placé dans les fioles soient légèrement différentes (au maximum 2 °C). Cette différence est constante, il suffira d'en prendre note et de régler en conséquence les cuves thermostatiques. Cette différence est due au léger échauffement des bobines d'agitation magnétique. Par contre, selon le fabricant, la température des différentes fioles est toujours la même, à $\pm 0,2$ °C près. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question de réglage de la température.

Pour la mise en marche de l'agitation magnétique, il faut abaisser l'interrupteur ; le réglage de la vitesse se fait par un bouton spécial et celui de l'intensité par un autre bouton, après avoir mis en place les fioles avec leur barreau d'agitation.

Pour le réglage initial du départ des courbes et les autres précautions à prendre, nous renvoyons au travail de DURRER (12).

Mesure gazométrique au moyen du tube de Besson modifié

On introduit dans un tube de culture 5 ml de milieu liquide, puis on y dispose un tube renversé de 6 cm de long et de 0.6 cm de diamètre, d'une contenance de 1,5 ml et gradué au 1/10^e. On exprime les résultats du

dégagement gazeux en millilitre ou fraction de millilitre en les lisant directement sur les graduations du tube.

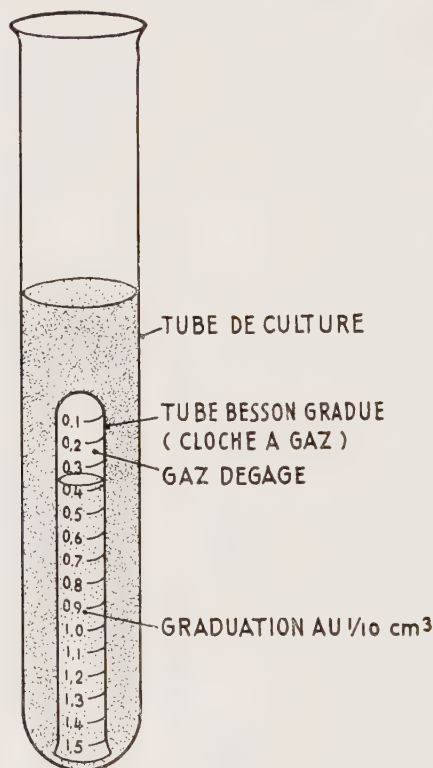


Fig. n° 3. — Tube de Besson modifié

Après stérilisation, ce tube renversé se remplit automatiquement de milieu par le refroidissement et permet d'évaluer la quantité de gaz dégagé dans un temps donné.

Les tubes ainsi préparés sont ensemencés avec une suspension homogène et de degré turbidimétrique toujours identique de *Zymomonas mobile* ; pour ce faire, on utilise une pipette de Pasteur jaugée à vingt gouttes par millilitre. Il faut veiller à ce que la quantité du milieu nutritif dépasse la cloche à gaz, ce qui permet de lire avec facilité le niveau du gaz développé.

En nous basant sur les travaux de FAUDI (13) nous avons tenté de contrôler la croissance de *Zymomonas mobile* par une méthode aussi simple que possible, en évaluant quantitativement le gaz carbonique mis en liberté. On peut poser comme principe que plus il y a de facteurs biostimulants, plus la croissance démarre vite et par conséquent plus le déga-

gement gazeux est précoce. La quantité de gaz mise en liberté dans un temps donné permet ainsi de déterminer le taux des Biostimulines.

Nous avons par conséquent introduit 5 ml de milieu liquide à double concentration, dont la formule est :

Bacto Pantothenat Medium Difco	4,0 g
Calcium-pantothenat	20,0 γ
Chlorure de calcium	0,2 g
Glucose	2,0 g
Eau distillée	50,0 ml

dans des tubes standardisés, puis on ajoute avec les garanties d'asepsie nécessaires, les quantités d'extrait biogène à tester et on complète à 10 ml au moyen d'eau distillée. On introduit alors la cloche à gaz et on tyndallise, puis on ensemence en partant d'une culture mère âgée de 24 heures. On dispose la gamme de tubes à 27 °C et on contrôle la croissance de la bactérie en rapport avec la quantité de gaz développée après 12-24-36 et 48 heures.

On détermine tout d'abord par tâtonnements la quantité d'extrait biogène se prêtant le mieux à ces conditions expérimentales, car si la dose de Biostimulines est trop petite, le temps d'expérience est trop prolongé ; si elle est trop forte, par contre, elle peut interrompre prématurément la croissance par un processus de bactériolyse.

Pour ces essais préliminaires, nous avons employé un extrait de germes de céréales âgé de deux ans, que nous avons utilisé comme référence dans nos expériences ultérieures. Il s'agit d'une macération aqueuse à 20 % de germes de maïs de la Maison DUMORTIER.

Nous avons établi une gamme contenant 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 ml de cet extrait de germes de maïs. Cette expérience nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU N° I

*Mesure de l'activité gazogène de Zymomonas mobile
en présence de germes de maïs*

Extrait de germes de maïs ml	Dégagement gazeux (en ml) après X heures							
	12	24	36	48	60	72	84	96
0,5	—	—	—	0,3	1,0	1,1	1,5	
1,0	—	—	0,2	0,7	1,1	1,5		
2,0	—	0,1	0,4	1,0	1,5			
3,0	±	0,5	1,0	1,5	1,5			
5,0	±	0,5	0,8	1,3				

Ces essais ont été pratiqués en cinq séries et les valeurs indiquées dans le tableau représentent la moyenne de ces cinq dosages. Nous faisons remarquer que ces expériences ont été pratiquées sur le milieu Difco à double concentration et sans addition de glucose ; dans d'autres expériences, nous avons obtenu une croissance beaucoup plus rapide par l'adjonction de ce sucre.

Après avoir constaté que 3 ml de notre extrait biogène fournissaient les meilleurs résultats, nous avons employé cette dose comme témoin dans nos expériences ultérieures.

Méthode biophotométrique

Partant de la méthode de mesure du dégagement gazeux, nous avons établi notre technique biophotométrique, dans laquelle on mesure le développement de la bactérie-test en rapport direct avec la Biostimuline. La croissance des germes occasionne un trouble directement proportionnel au développement, que l'on peut mesurer au moyen de cellules photo-électriques de l'appareil de Bonet-Maury.

Mode opératoire

On introduit dans les fioles standard de l'appareil de Bonet-Maury le même substrat que précédemment ; l'appareil permet de doser simultanément cinq concentrations différentes de la même Biostimuline et un témoin exempt d'extrait biogène.

Pour stériliser les fioles, nous avons employé tout d'abord des bouchons de caoutchouc, ceux en coton cardé inhibant la croissance du *Zymomonas*. Dans ces conditions, le gaz carbonique ne peut pas s'échapper et il se produit à l'intérieur des fioles une surpression qui est défavorable au développement de la bactérie. Pour remédier à cet état de choses, nous avons modifié notre technique en munissant les bouchons de caoutchouc d'une aiguille hypodermique qui permet l'évacuation du CO_2 .

Nous reproduisons ci-dessous trois photographies illustrant les modifications apportées à l'appareillage :

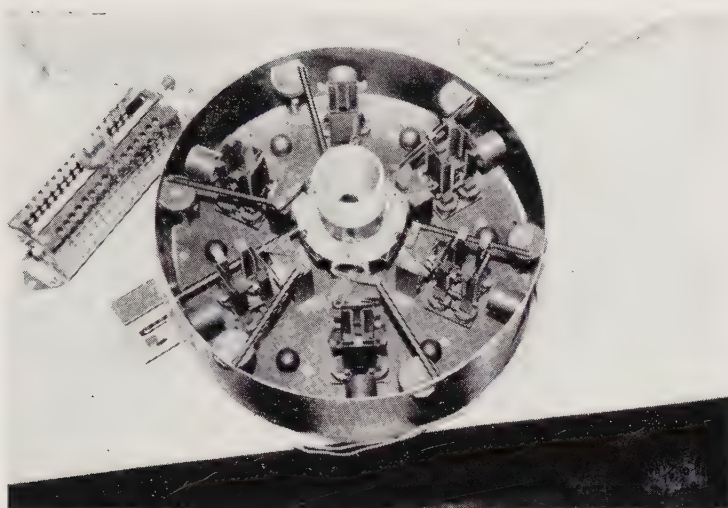


Fig. n° 4. — Disposition de deux fioles juxtaposées
dans l'enceinte thermostable du biophotomètre
(voir explication page 14)

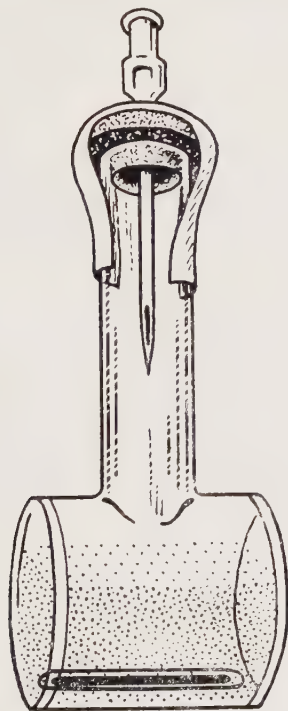


Fig n° 5. — Une fiole du biophotomètre
adaptée à nos conditions expérimentales

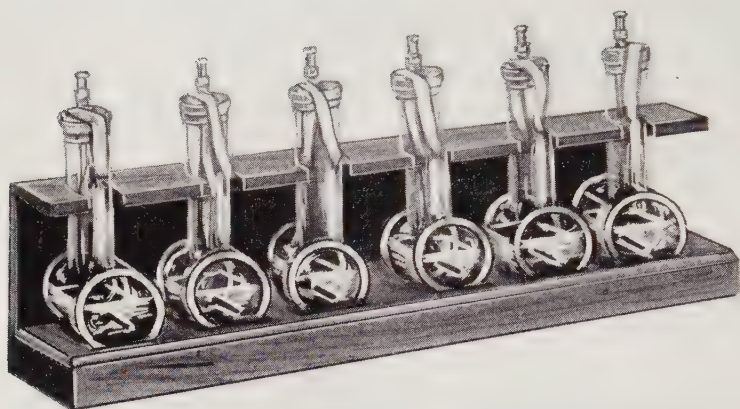


Fig. n° 6. — Support avec les six fioles munies de la fermeture à bouchon de caoutchouc et aiguille hypodermique

Pour stabiliser la température, nous avons introduit entre la fiole en expérience et la lampe d'éclairage une seconde fiole de 1 cm de diamètre périodiquement remplie d'eau froide. Les bouchons de caoutchouc munis de l'aiguille hypodermique sont fixés au moyen d'une bande de leucoplast sur le col de la fiole.

Ces modifications nous ont permis d'obtenir des résultats satisfaisants, comme cela ressort du graphique ci-après (page 15).

Si l'on compare les résultats de ce graphique avec ceux enregistrés dans le tableau n° 1, on constate que les courbes néphélométriques évoluent plus rapidement que le dégagement gazeux. Ce fait s'explique facilement par l'amorcement du dégagement gazeux qui se manifeste seulement au moment où le nombre de germes est suffisant pour amener des modifications chimiques du milieu. On peut constater macroscopiquement le même fait en observant les tubes de culture où le trouble apparaît bien avant le dégagement de CO_2 .

Tous ces essais préliminaires avaient déjà été effectués par notre pré-décèsseur, mais il nous a paru indispensable de les reprendre, à la fois pour contrôler ces méthodes que nous comptons utiliser dans la suite de nos travaux, et pour les avoir bien en mains.

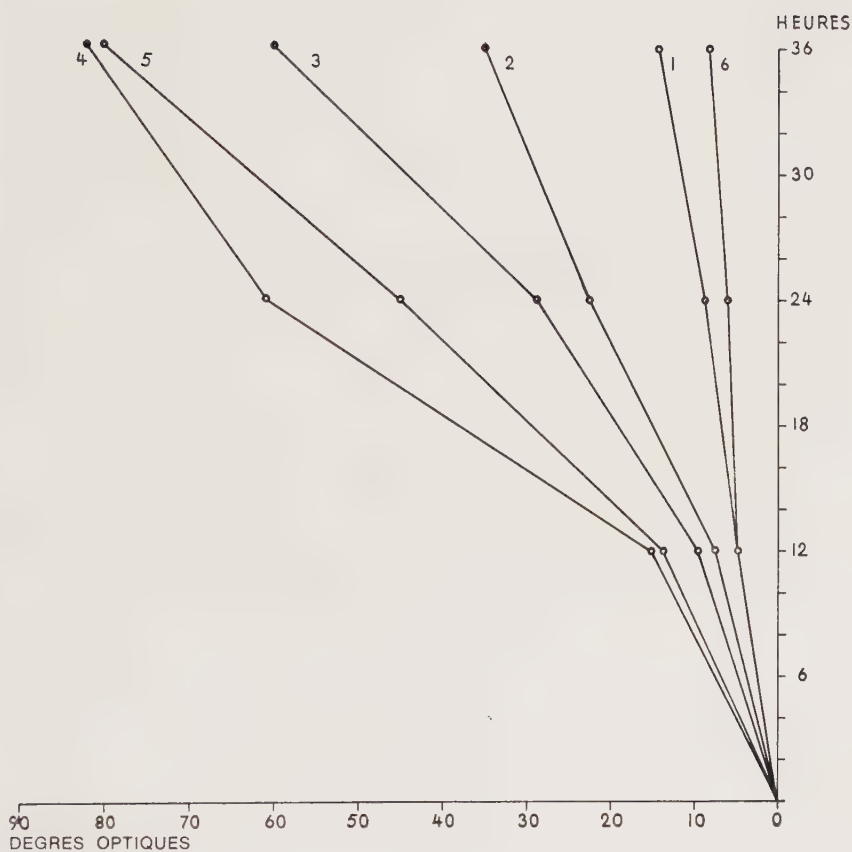


Fig. n° 7

Graphique montrant les courbes de croissance de *Zymomonas mobile* en rapport avec les doses de 0,5 (courbe 1) — 1,0 (courbe 2) — 2,0 (courbe 3) — 3,0 (courbe 4) — 5,0 (courbe 5) cc d'extrait de germe de maïs à 20 % et le milieu témoin (courbe 6)

CHAPITRE II

GÉNÉRALITÉS SUR LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Avant de passer à l'exposé de nos travaux personnels, il nous a paru nécessaire de rappeler quelques points d'histoire sur la chromatographie en général.

Michel TSWETT, botaniste russe, fut le premier en 1906 à décrire une méthode de séparation des pigments par adsorption chromatographique, dans son ouvrage intitulé « *Les chromophylles dans le monde animal et végétal* ». C'est lui qui fut le créateur de la chromatographie, en se basant sur l'analyse capillarimétrique inventée par l'Alsacien GOPPELSROEDER (14), qui dirigeait alors l'Ecole de Chimie de Mulhouse.

Ce n'est qu'en 1931 que cette méthode commença à se développer avec les travaux de KUHN et LEDERER (15) qui séparaient des carotènes et des xanthophylles. A partir de cette époque la chromatographie est devenue de grande importance pour la chimie organique. Des travaux très nombreux ont été effectués dans ce domaine, en ayant recours à cette méthode.

En 1947, enfin, la chromatographie s'est assurée aussi sa place en chimie minérale avec la séparation de terres rares et de corps radioactifs sur échangeurs d'ions, dans les recherches des Américains BOYD, MARINSKY, SPEDDING, TOMKINS, etc. (16).

La constitution chimique d'une substance par rapport à la chromatographie

Les phénomènes qui se produisent au cours d'une séparation chromatographique varient d'après la nature chimique de la substance. Il peut s'agir d'une adsorption vraie, d'un partage entre deux solvants ou d'un échange d'ions.

Dans certains cas, il est difficile de déterminer lequel des trois phénomènes est le plus important.

Adsorption vraie

Presque toutes les adsorptions en milieu organique, sur charbon, alumine, chaux, carbonate de calcium, magnésie, silice, etc., ainsi que celle

sur charbon en milieu aqueux sont dues à une adsorption vraie. Les recherches faites entre 1931 et 1938 sont résumées par LEDERER et ont prouvé qu'une substance sera adsorbée d'autant plus qu'elle contient plus de doubles liaisons et de groupements —OH. Ainsi, on a établi le classement suivant :

- Acides et bases ;
- Alcools, thiols ;
- Aldéhydes, cétones ;
- Substances halogénées, esters ;
- Hydrocarbures non saturés ;
- Hydrocarbures saturés.

Les substances les plus fortement adsorbées sont indiquées en premier, les moins adsorbées en dernier.

Chromatographie de partage

C'est le rapport entre la constitution chimique et le coefficient de partage qui est ici de première importance. Tout changement de structure qui peut influencer la solubilité relative dans les deux solvants, change la place de la substance dans le chromatogramme de partage. Le coefficient de partage dépend surtout de la nature des différents groupes de la molécule, leur position n'a que peu d'importance. C'est pour cette raison que la chromatographie de partage sera la méthode classique pour la séparation de séries homologues, tandis que la chromatographie par adsorption est plus indiquée pour les séparations d'isomères o, m et p. C'est surtout dans la chromatographie de partage des acides aminés que se montre clairement ce rapport entre structure chimique et coefficient de partage, du fait de certaines régularités d'emplacement des taches. Sur un chromatogramme à deux dimensions (phénol — butanol, par exemple) les monoamino-acides aliphatiques : glycocolle, alanine, acide aminobutyrique, valine, leucine, se trouvent répartis sur une courbe, les bases hexoniques sont voisines, tandis qu'il n'en est pas de même pour les acides aminés dicarboxyliques.

Echange d'ions

Cette méthode est surtout importante pour la séparation des substances hydrosolubles. La charge électrique des substances entraîne le comportement sur la colonne d'échangeurs. Les substances neutres ne sont pas adsorbées ; les acides sont retenus par les échangeurs d'anions, les bases par les échangeurs de cations. La combinaison des deux colonnes d'échangeurs permet alors de séparer un mélange de substances hydrosolubles en trois groupes (bases, acides, neutres) comme l'a démontré TISELIUS (17).

Comme nous nous sommes servis essentiellement de la chromatographie de partage sur papier, nous allons étudier cette technique plus en détail.

La chromatographie de partage sur papier

L'appareil classique se compose d'un récipient étanche en verre, saturé de vapeur d'eau et du solvant organique employé. Au début de l'essai, on dépose sur un coin d'une feuille de papier filtre spécial qui sert de support à la phase aqueuse, une goutte de la solution à analyser et on suspend la feuille verticalement, le bord inférieur immergé dans une cuve cylindrique en acier inoxydable ou en verre, contenant le solvant migrateur non miscible à l'eau. Comme exemple, nous avons choisi ici une solution d'acides aminés.

Chromatographie en une dimension

Le solvant migrateur monte lentement le long du papier et, suivant leur coefficient de partage, les acides aminés se déplacent, les substances plus hydrosolubles restant en arrière tandis que les substances plus liposolubles sont entraînées plus loin.

Selon le solvant employé, les coefficients de partage des acides aminés sont assez différents et, en se basant sur ce fait, on effectue d'abord un chromatogramme dans une direction, ce qui sépare les amino-acides dans un seul sens, c'est-à-dire suivant une ligne verticale.

Chromatographie en deux dimensions

Après avoir séché la feuille, on la dépose dans la cuve en la tournant selon un angle de 90° par rapport au premier déplacement et on laisse opérer un second solvant, ce qui permet une nouvelle séparation suivant une autre ligne verticale. Après séchage du chromatogramme, on rend les acides aminés visibles, qui se sont déplacés, en vaporisant sur la feuille une solution d'un révélateur qui fait apparaître des taches colorées par suite d'une réaction chimique. Sur ce chromatogramme bidimensionnel, ces taches sont disséminées sur toute la feuille.

Choix du papier chromatographique

La chromatographie sur papier constitue un travail très minutieux, pour lequel la qualité du papier est de toute première importance. Le papier le plus connu et le plus utilisé est le *Whatman* n° 1. Il existe aussi des papiers *Whatman* n° 2 et n° 4, d'épaisseur différente, qui modifient la durée de l'opération. Les papiers *Munktell* OB et OA, suédois, sont assez lents, mais donnent des taches petites et bien délimitées. Les papiers allemands *Schleicher* et *Schüll* n° 587, le français *Durieux* n° III ont servi à plusieurs auteurs pour leurs essais. Quant à nous, nous nous sommes servis le plus souvent du *Whatman* n° 1, ce qui nous permettait un développement assez rapide. Pour la même raison, nous avons fait sécher les feuilles à 100-105 °C au lieu de les abandonner à la température de 24-30 °C comme le font certains auteurs. Il faut éviter de placer le chromatogramme dans une étuve dont la température est inférieure à 70 °C pour éviter un jaunissement provoqué par une durée trop prolongée du séchage, comme le font remarquer PRATT et AUCLAIR (18).

Choix des solvants

Les solvants migrateurs les plus utilisés dans la chromatographie sur papier sont ceux qui sont partiellement miscibles à l'eau. Nous envisageons ceux qui donnent les meilleurs résultats pour la séparation de nombreuses substances.

1. Phénol

La pureté du phénol employé doit être très grande, car les moindres impuretés donnent des taches brunes sur le papier qui se localisent à différents endroits au fur et à mesure de la migration le long du papier. Il y a donc lieu de redistiller le phénol pour utiliser seulement la fraction qui passe à 182 °C. Pour le conserver liquide, on fait une solution-stock en le diluant avec de l'eau distillée dans la proportion de 90 + 10 (v/v). Cette solution phéniquée doit être conservée dans des flacons bien bouchés et à l'abri de la lumière. Au moment de l'emploi, on mélange dans une ampoule à décantation une partie de cette solution-stock avec un excès d'eau en agitant très doucement. Après avoir laissé reposer au moins 12 heures, on décante et on place la couche supérieure constituée par de l'eau saturée de phénol, dans un cristalliseur que l'on dépose au fond de la chambre chromatographique, afin de réaliser dans celle-ci une atmosphère saturée d'eau et de solvant nécessaire pour pratiquer la réaction.

La couche inférieure qui s'est séparée dans l'ampoule à décantation représente le solvant migrateur (phénol saturé d'eau) que l'on introduit dans la cuve où trempe le bord du papier.

2. Butanol - acide acétique

Dans une ampoule à décantation on mélange :

n-butanol	80 ml
acide acétique cristallisé	20 ml
eau distillée	100 ml

On mélange soigneusement et laisse décanter pendant au moins 12 heures. Après ce temps, on obtient également deux phases, la couche inférieure aqueuse est employée pour saturer l'atmosphère, la couche supérieure représente le solvant migrateur.

3. Collidine

Pour préparer ce réactif, on mélange à parties égales (v/v) :

2-4-6-collidine (2-4-6-triméthylpyridine)
eau distillée.

Le grand inconvénient de la collidine réside dans la variation du déplacement des taches suivant l'origine du produit. Nous ne l'avons pas utilisée et nous n'insistons pas, par conséquent, sur ce réactif.

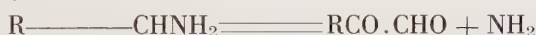
Choix du révélateur

Le révélateur le plus couramment employé est la *ninhydrine*, qui est un indicateur très sensible. En général, on se sert d'une solution à 0,1 % de ninhydrine dans le butanol.

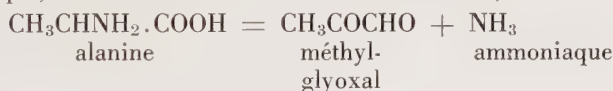
Les taches de presque tous les acides aminés ont sensiblement la même couleur, variant du violet-pourpre au violet-bleu, sauf quelques exceptions, et c'est là le seul inconvénient de cette technique. Nous énumérons ci-après les acides aminés donnant des taches tout à fait caractéristiques après l'action de la ninhydrine :

Proline	jaune
Hydroxyproline	rouge-orangé
Histidine	rouge-gris terne
Tyrosine	brunâtre

BAKIN (19) a expliqué de la façon suivante la réaction chimique faisant apparaître ces colorations : L'acide aminé est décomposé en ammoniaque et en glyoxal :



Si, par exemple, on utilise comme acide aminé l'alanine, on a :



Comme les glyoxals sont de très forts réducteurs (ils réduisent même la solution de Fehling à froid) ils agissent sur la ninhydrine qui est réduite de la manière suivante :

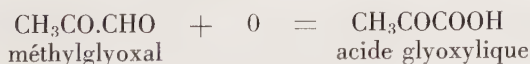


Ninhydrine

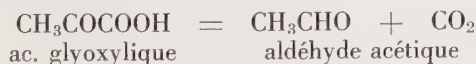
(hydrate de tricétohydrindène)

1,3 dicéto-hydrindol

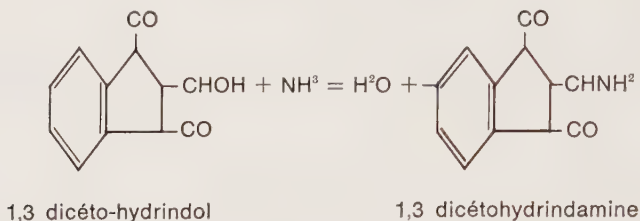
tandis que le méthylglyoxal se transforme par oxydation en acide glyoxylique :



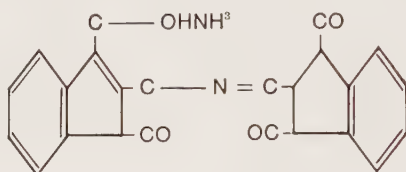
Ce dernier est très instable et se décompose en aldéhyde acétique d'après la réaction suivante :



L'ammoniaque de l'acide aminé se condense avec ce dernier produit :



Cet amine donne, après condensation avec l'ammoniaque et une molécule de ninhydrine, un sel d'ammonium de couleur bleu-violet :



Discussion théorique sur le processus chromatographique

Comme nous l'avons vu précédemment, les différentes substances contenues dans la goutte déposée au coin de la feuille se déplacent à des vitesses qui ne dépendent que de leur coefficient de partage entre le solvant organique et l'eau retenue par le papier. Ainsi, les produits plus solubles dans le solvant seront entraînés plus loin, tandis que les substances hydrosolubles se déplaceront à des distances moindres.

L'emplacement des acides aminés peut être calculé d'après le coefficient de partage, et correspond sensiblement à la position établie expérimentalement avec des solutions témoins.

Pour un solvant donné, la position de chaque acide aminé sur la carte chromatographique est caractérisée par son R_f :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

Dans la séparation sur colonne, le gel de silice que l'on emploie remplace dans son rôle de support et de phase stationnaire la cellulose utilisée dans la chromatographie sur papier.

CONSDEN, GORDON et MARTIN (20) ont proposé une théorie analogue à celle développée par MARTIN et SYNGE (21) pour la chromatographie sur gel de silice. Soit pour la chromatographie de partage sur colonne :

A = surface de la section transversale de la colonne ;

A_s = surface de la section transversale de la phase stationnaire ;

A_l = surface de la section transversale de la phase mobile ;

A_i = surface de la section transversale du solide inerte ;

$$A = A_s + A_l + A_i$$

$$a = \frac{\text{le coefficient de partage défini par le rapport :}}{\text{gramme de corps dissous/litre de phase stationnaire}} \\ \text{gramme de corps dissous/litre de phase mobile}$$

$$R = \frac{\text{Déplacement de la position du maximum de concentration}}{\text{du corps dissous}} \\ \text{Déplacement simultané de la surface du liquide de développement} \\ \text{(phase mobile) dans la partie du tube} \\ \text{au-dessus de la colonne d'adsorbant}$$

$$R = A/Al + aAs \qquad a = A/RAs - Al/As$$

Soit pour la chromatographie sur papier :

As = surface de la section transversale de la phase aqueuse ;

Al = surface de la section transversale de la phase solvante ;

A = surface de la section transversale du papier, de la phase aqueuse et de la phase solvante ;

$$a = \text{coefficient de partage} = \frac{\text{concentration de la phase aqueuse}}{\text{concentration de la phase solvante}}$$

R n'est pas directement mesurable dans la chromatographie sur papier.

Un nouveau coefficient est alors utilisé :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par la substance dissoute}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

$$\text{On a : } Rf = \frac{R Al}{A}$$

$$\text{D'après la théorie précédente : } R = \frac{A}{Al + aAs}$$

$$\text{donc : } Rf = \frac{Al}{Al + aAs}$$

$$a = \frac{Al}{Rf \cdot As} - \frac{Al}{As} \qquad a = \frac{Al}{As} \left(\frac{1}{Rf} - 1 \right)$$

Al/As est égale au rapport des volumes de la phase solvante et de la phase aqueuse du chromatogramme. En admettant que le papier ait une capacité donnée de fixation d'eau, Al/As peut être déduit du rapport du poids du papier sec à celui du chromatogramme développé.

Les distances parcourues par les différentes substances dépendent :

- 1° Du coefficient de partage de la substance envisagée entre l'eau et le solvant ;
- 2° Du volume de l'eau retenue par l'unité de surface du papier filtre ;
- 3° Du volume de solvant saturé d'eau par unité de surface de papier filtre irrigué par ce solvant.

Pour une même expérience, ces deux derniers facteurs peuvent être considérés comme constants, si le papier est uniforme dans sa texture, son épaisseur et sa capacité de fixation d'eau.

Le Rf dépend donc essentiellement du coefficient de partage. Pour nos essais menés pour la plupart dans les mêmes conditions expérimentales, nous n'avons calculé que les Rf des différents acides aminés que nous avons comparés avec les résultats de nos témoins et ceux d'autres chercheurs, en particulier de GEHRIG (22).

Le calcul du Rf se fait d'une façon très simple. La distance parcourue par les substances chromatographiées se mesure à partir de la ligne d'origine où l'on pose la goutte de solution inconnue, et jusqu'au centre de la tache révélée sur le papier. Ce nombre est divisé par la valeur qu'on obtient en mesurant la distance parcourue par le solvant migrateur, de la ligne de départ jusqu'au front du solvant.

Chromatographie en couche mince

Nous avons souvent utilisé aussi la chromatographie en couche mince, et nous décrivons ci-dessous l'appareillage et la technique précisés par les Laboratoires CAMAG (23) :

Adsorbants

Le grand avantage de la *chromatographie en couche mince* est que l'adsorbant peut être choisi en fonction des éléments à séparer. Alors que la chromatographie sur papier est seulement une chromatographie de partage, la technique en couche mince permet des séparations aussi bien d'adsorption que de partage. Naturellement, la haute qualité des résultats dépend d'une sélection rigoureuse des adsorbants.

A cet effet, il existe toute une gamme d'adsorbants, avec ou sans sulfate de calcium en tant que liant. L'avantage du liant est de donner plus de solidité à la couche, et dans certains cas l'effet de dilution du liant peut provoquer des séparations améliorées, mais d'une façon générale, il est recommandé d'employer des adsorbants sans liant, sauf pour les couches supérieures à 1 mm, où le liant est obligatoire.

Bien des substances sont fluorescentes sous un rayonnement UV à onde longue (350 m μ). Cette méthode très sensible peut être utilisée avec chaque adsorbant. Les substances du large groupe absorbant le rayonnement UV à onde courte (254 m μ) peuvent être détectées si un indicateur fluorescent

est incorporé à l'adsorbant. Dans ce cas, les substances apparaîtront sous forme de taches noires sur fond clair, parce qu'elles absorbent la lumière excitatrice.

Il est recommandé de chromatographier les substances inconnues sur des adsorbants comportant un indicateur UV. Cette technique d'identification est simple, précise, élégante et a l'avantage de ne pas léser les substances en étude.

Revêtement des plaques

Les plaques de verre sont revêtues du mélange adsorbant à l'aide d'un applicateur, grâce à quoi :

1° L'épaisseur de la couche peut être réglée à toute valeur jusqu'à 2 mm ;
2° L'uniformité de l'épaisseur de la couche est parfaite sur toute la plaque ;

3° On peut préparer autant de plaques qu'on le désire en une seule fois.

L'appareil est fait d'un alliage spécial d'aluminium résistant aux acides, permettant ainsi l'usage de pâtes contenant du nitrate d'argent.

Les plaques où est étalée la couche adsorbante sont faites d'un verre de première qualité d'environ 4 mm d'épaisseur, à bord chanfreiné. Chaque plaque est soigneusement calibrée pour une utilisation parfaite.

Le magasin de l'applicateur est chargé du nombre de plaques voulu. Le mécanisme d'entraînement pousse les plaques à travers le sabot sur le support des plaques. La série de plaques revêtues est ensuite enlevée avec le support muni de deux poignées.

Séchage

Les plaques revêtues sont simplement placées dans les cuvettes d'aluminium ; chaque cuvette peut recevoir une plaque de 20 cm $\times$ 20 cm ou une surface équivalente de plaques plus petites. Généralement, les cuvettes sont superposées pour former un ensemble compact, mais s'il est nécessaire d'accélérer le séchage, les cuvettes peuvent être superposées en disposition croisée. Le séchage à une température de 100-110 °C est d'une durée minimale d'une heure.

Après séchage, l'ensemble des cuvettes superposées est mis dans une boîte en fer blanc fermée où on les conserve jusqu'à l'emploi individuel des plaques. Ce stockage peut durer plusieurs semaines.

Dépôt de l'échantillon

La solution à étudier est déposée sur la couche à l'aide d'une micropipette. Cette pipette à autoremplissage comporte un support formant manche et un embout capillaire calibré. Les deux éléments sont assemblés par rodage standard. Ces micropipettes présentent des avantages :

Elles sont d'une manipulation rapide et facile du fait de l'absence d'ajustage à un trait de jauge, d'une excellente reproductivité et d'un nettoyage facile.

Lors de l'application de l'échantillon sur l'absorbant, le bout de la pipette est directement en contact avec la couche. Le guide de dépôt ou gabarit sert à positionner la pipette avec précision sans risque d'endommager la couche souvent délicate.

Développement du chromatogramme

Le développement du chromatogramme est assuré par le solvant qui, par capillarité, se déplace de façon ascendante dans la couche d'adsorbant. Il se fait dans des chambres de développement en verre. Dans la chromatographie en couche mince, pour éviter des chromatogrammes irréguliers ou inclinés, il est généralement nécessaire de saturer l'atmosphère de la chambre de développement avec des vapeurs de solvant. Le degré de saturation suffisant est dans la plupart des cas obtenu par la mise en place sur une des faces intérieures de la cuve d'une feuille de papier filtre imbibée de solvant.

Visualisation

Les substances séparées sont rendues visibles par la pulvérisation de réactifs appropriés ou par émission de rayonnement UV.

Pour la vaporisation du révélateur, on utilise de préférence un pulvérisateur en verre, en forme d'Erlenmeyer. La tête du pulvérisateur est assemblée au récipient par rodage et munie d'une poire en caoutchouc.

Il est parfois intéressant de détacher le chromatogramme de sa plaque de support en vue de sa conservation. Ceci peut être fait par un procédé en trois temps : Le chromatogramme est recouvert par pulvérisation d'une laque spéciale de fixation, puis il est détaché de son support et renforcé par une feuille adhésive.

Séparation par chromatographie en couche mince sur microplaques

Le procédé « *micro* » constitue un gain de place et souvent de réactifs, de solvants et de temps de migration. Il rend de grands services pour la prédétermination des solvants. Cette technique est conçue en tant qu'auxiliaire du procédé sur plaques standard. Ce n'est que dans les cas exceptionnels que la méthode sur microplaques peut remplacer la technique normale. Par exemple : séparations simples de routine, suites de réactions chimiques, étalonnage d'éléments de chromatographie sur colonne. Mais la micro-

méthode est précieuse lorsqu'un choix optimal d'un système de solvants doit être fait. L'économie d'adsorbants et de produits chimiques, le peu de place requise, le temps rapide de migration permettent de tester un beaucoup plus grand nombre de solvants qu'il serait possible de le faire avec des plaques de dimension standard.

Le procédé de chromatographie en couche mince sur microplaques se pratique de la même manière qu'avec les éléments standard.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

ÉTUDE DES MILIEUX DE CULTURE ET ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Nous avons effectué un certain nombre d'expériences avec différents milieux nutritifs pour sélectionner le plus apte à la culture de la bactérie-test, *Zymomonas mobile*, et se prêtant le mieux au dosage des Biostimulines. Nous avons tout d'abord préparé un milieu déjà employé par J. MEYER et ses collaborateurs :

Bacto Brain Heart Infusion Agar Difco, dehydrated	1,0 g
TC Yeastolate Difco	1,0 g
Standard Merck I (Nachragar 805/500 d'après Kuczinsky) ..	1,0 g
Glucose	2,0 g
Carbonate de calcium	2,0 g
Eau distillée	100,0 g

Après pesée, on réunit les différentes substances, à l'exception du carbonate de calcium, dans un ballon de 500 ml, on ajoute 50 ml d'eau distillée et on chauffe au bec Bunsen jusqu'à dissolution. Le carbonate de calcium est ensuite mélangé aux 50 ml d'eau restants, on mélange soigneusement pour faire une suspension homogène qui est chauffée et réunie à chaud à la solution précédente. On mélange bien et on distribue en tubes de culture à raison de 15 ml par tube. On stérilise à l'autoclave à 110 °C pendant 20 minutes ; on refroidit rapidement sous eau courante en agitant les tubes, puis on laisse solidifier le milieu en position inclinée.

Le second substrat a été préparé d'après les données du « *Centralbureau voor Schimmelcultures* » de Delft (Pays-Bas) que le Docteur W. SLOFF nous a aimablement communiquées :

Extrait de levure Difco	2,0 g
Glucose	2,0 g
Carbonate de calcium	2,0 g
Eau distillée	100,0 g

La préparation de ce milieu est identique à celle du précédent. et on stérilise également pendant 15 minutes à 110 °C.

D'autre part, nous avons préparé le même milieu en le solidifiant par adjonction de 2 % de *Difco Bacto Agar*.

Ces trois milieux se sont avérés peu favorables à la culture de nos souches de *Zymomonas mobile*. La croissance des germes était relativement lente et les colonies avaient un aspect peu caractéristique. Ces expériences ont été effectuées avec une souche de *Zymomonas mobile* de Londres et une souche d'origine américaine. A la suite de ces résultats peu encourageants, nous avons renoncé à ces trois milieux par la suite.

Un autre milieu peu favorable a été également essayé ; il était constitué par :

Yeastolate Difco	2,0 g
Protéolysat « Ronchèse »	2,0 g
Glucose	4,0 g
Eau distillée	100,0 g

Après dissolution par chauffage, le pH du milieu initialement de 5,4 est ajusté entre 6,5 et 7,0 au moyen de Lessive de soude. Remarquons que le *Protéolysat Ronchèse* est un hydrolysate déshydraté de protéines plasmatiques musculaires et de lait, à propriétés enzymatiques et réaction acide.

Nous avons expérimenté ensuite un substrat indiqué par l'*Institut d'Aberdeen* :

Malt Extract Difco	3,0 g
Yeast Extract Difco	1,0 g
Sucrose	2,0 g
Eau distillée	100,0 g

On stérilise à 115 °C pendant 20 minutes et la culture de la bactérie-test s'effectue à 30 °C. Ce milieu est très favorable au développement de *Zymomonas mobile* ou immobile, mais seulement en anaérobiose. C'est la raison pour laquelle nous l'avons également abandonné.

Le milieu solide qui s'est avéré le plus favorable dans nos expériences était celui fourni par l'*American Type-culture Collection*, *Rockville* (Maryland), modifié légèrement par J. MEYER :

Difco Yeast Extract	1,0 g
Difco Brain Heart Infusion	1,0 g
Difco Tryptose Broth	2,0 g
Difco Agar	2,0 g
Sulfate de fer (FeSO ₄)	trace
Glucose ou saccharose	2,0 g
Eau distillée	100,0 ml

Par la suite, nous avons modifié la formule en utilisant 3 g de Difco Agar au lieu de 2 g, pour obtenir un milieu plus solide.

On introduit le tout dans un ballon de 500 ml, on chauffe jusqu'à dissolution. Le pH est ajusté à 7,2 puis on répartit en tubes et stérilise à 120 °C pendant 15 minutes. Ce substrat est un milieu de conservation pour le *Zymomonas* et ceci même pour des périodes assez longues. La souche de *Zymomonas* d'origine américaine se développe sur ce milieu en formant des colonies humides à sa surface tandis que la souche de *Zymomonas* anglaise donne des colonies en profondeur qui, par la suite, provoquent la dislocation du milieu par formation de gaz, alors que les colonies se développant en anaérobiose au fond du tube y forment des taches laiteuses. D'habitude, les colonies microbiennes devenaient macroscopiquement visibles au bout de 1 à 2 jours à la température de 27 °C. La vitalité des germes était encore satisfaisante après 3 mois de conservation sur ce milieu.

Le meilleur substrat pour l'entretien des souches de *Zymomonas* est constitué par le moût de bière non houblonné, additionné de 4 % de glucose. On emploie de préférence un moût de bière fraîchement préparé à la brasserie, que l'on traite ensuite de la façon suivante :

On passe à travers un filtre de Seitz sous pression, ou pour gagner du temps, on peut filtrer à travers du papier Chardin. Le moût ainsi clarifié est additionné de 4 % de glucose puis ajusté à pH entre 6,8 et 7,0 avec de la lessive de soude. On stérilise à l'autoclave à 110 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, il se forme d'habitude un léger précipité. On a intérêt à ne pas dépasser les 20 minutes, car un chauffage plus prolongé accentue encore la précipitation.

Le milieu ainsi préparé doit de nouveau être filtré, soit sur papier Chardin soit sur filtre de Seitz, après avoir ajusté le pH à 7,0.

Pour obtenir un milieu solide, on y incorpore soit 2 % de *Difco Bacto Agar*, soit 20 % de gélatine *Merck*. On répartit en tubes de culture et on stérilise pendant 20 minutes à 110 °C.

Le moût de bière simple peut être conservé en ballons après une première filtration à travers un filtre Seitz et stérilisation à 110 °C pendant 20 minutes. Cette conservation est particulièrement nécessaire en hiver, où les brasseries fabriquent moins souvent du moût de bière frais.

Le moût de bière liquide se prête très bien au maintien des propriétés vitales et biologiques du *Zymomonas*, à condition de le repiquer au moins une fois par semaine. On peut alors constater, dès le lendemain de l'ensemencement, la formation de gaz (CO_2) provenant de la dégradation enzymatique du glucose. La température optimale de développement de nos germes se situe entre 27 °C et 30 °C.

Il faut noter que nos souches ne se développaient pas sur le moût de bière solide, ce pourquoi nous avons également renoncé à l'emploi de ce milieu. D'autre part, nos expériences ont prouvé qu'une troisième stérilisation du milieu liquide empêche le développement du *Zymomonas*, probablement par destruction de facteurs de croissance indispensable au germe. Il est indubitable que des facteurs de croissance ou des Biostimulines

contenus dans le moût de bière provoquent ce développement rapide et spectaculaire du *Zymomonas*. Etant donné que nous voulions doser et contrôler l'activité des Biostimulines, il nous fallait employer un substrat dépourvu de ces facteurs, mais à composants nettement définis. Nous avons donc eu recours à la formule suivante :

Bacto Pantothenat Medium Difco	4,0 g
Calcium pantothenat	20,0 γ
Chlorure de calcium	0,2 g
Glucose	2,0 g
Eau distillée	100,0 ml

déjà employé avec succès par FAUDI. Les différents composants sont pesés, introduits dans un ballon avec l'eau distillée et portés à ébullition pendant 3 minutes. D'après cet auteur, la dissolution devrait être complète à ce moment, mais comme cela n'a jamais eu lieu dans nos essais, nous filtrions chaque fois le liquide à travers du coton hydrophile pour obtenir un milieu limpide. Nous stérilisons selon les indications du « *Difco Manual* » pendant 10 minutes à 121 °C. Le *Zymomonas* ne se développe que très lentement dans ce milieu contenant toutes les vitamines et facteurs de croissance nécessaires aux bactéries ; il représente en quelque sorte un milieu de conservation. Il nous permet de contrôler très exactement l'influence de nos Biostimulines sur la croissance du germe, puisque la rapidité de cette dernière est directement proportionnelle à la dose de Biostimulines introduite. De plus, ce milieu est limpide et de couleur jaune pâle, ce qui facilite l'enregistrement des courbes par le biophotomètre.

En conclusion, nous pouvons dire que les milieux suivants se sont avérés les plus favorables à la culture de notre *Zymomonas mobile* :

- 1° Moût de bière non houblonné pour l'entretien et la vitalité du germe ;
- 2° Milieu solide selon la formule américaine ;
- 3° Milieu au pantothénate permettant de contrôler l'accélération de la croissance lors de l'addition de Biostimulines.

Essais préliminaires à l'aide de différentes bactéries-test

Nous avons tout d'abord eu recours à *Zymomonas mobile* Lindner et à *Proteus vulgaris* X-19.

Le *Zymomonas* conservé dans le Laboratoire de J. MEYER sous forme déshydratée depuis 1965 et provenant du « *Lister Institut* » de Londres, une fois réensemencé en moût de bière liquide, a présenté une croissance rapide et satisfaisante. Les cultures étaient pures et nous avons par conséquent adopté cette souche comme bactérie-test.

Différentes souches lyophilisées se sont montrées impures et il est absolument indispensable de contrôler de telles souches lyophilisées, quant à leur état de pureté, avant leur emploi.

Mentionnons que *Zymomonas mobile* est un germe très fragile qui nécessite pour son développement des doses importantes de glucose et d'autres substances hydrocarbonées qu'il transforme massivement en alcool et CO_2 avec acidification prononcée du milieu. La température optimale est de 27 °C et des températures supérieures à 30 °C lui sont fatales. Il est Gram-négatif, muni de cils que ILLIEN a très bien mis en évidence et reproduits en microphotographies. A l'examen direct, il s'agit d'un diplobacille mobile dont la taille est de 4-5 μ sur 1,4 à 2 μ .

Cette bactérie avait été choisie comme germe-test par nos prédécesseurs car elle ne se développe qu'en présence de Biostimulines. Celles-ci sont présentes naturellement dans le moût de bière, mais dans d'autres milieux synthétique ou à composition plus ou moins définie elles manquent, ce qui permet de les doser après introduction, au moyen précisément du *Zymomonas*.

Ce dosage peut être effectué aussi bien par turbidimétrie que par gazométrie. Dans le premier cas, on mesure la vitesse de croissance de la bactérie, dans le second le dégagement gazeux, qui est directement proportionnel à l'activité enzymatique du germe. Nous nous sommes référé à ce sujet aux travaux antérieurs de BURLET et FAUDI en ce qui concerne la mesure gazométrique au moyen du tube de Besson, et de ILLIEN qui a utilisé pour la première fois le biophotomètre de Bonet-Maury pour le contrôle turbidimétrique.

Nous avons jugé nécessaire de vérifier ces deux techniques en employant d'autres bactéries ; c'est pour cette raison que nous avons eu recours en premier lieu au *Proteus X-19*. La souche a été mise à notre disposition par le *Centre international de collection de types microbiens de Lausanne* (Suisse). Malheureusement, cette bactérie n'est pas gazogène et s'est révélée indépendante vis-à-vis de l'action des Biostimulines, par conséquent elle fut inutilisable dans nos essais.

Recherchant d'autres germes-test, nous avons aussi eu recours à une levure, *Hansenula anomala*, ceci surtout parce que cette levure dégrade également les glucides avec production de gaz. La souche était entretenue sur milieu solide et nous l'avons repiquée en moût de bière liquide. Ce substrat était très favorable, puisqu'au bout de 3 à 4 heures on pouvait déjà noter un trouble net du milieu et un dégagement gazeux important. Nous avons donc effectué des essais au moyen du biophotomètre, et le protocole expérimental est le suivant :

L'inoculation a été pratiquée au moyen d'une culture en moût de bière âgée de 16 heures et l'établissement de la gamme expérimentale ressort du tableau ci-après (n° 2).

La mesure est effectuée immédiatement après l'ensemencement, les fioles étant placées dans le biophotomètre. Nous avons pu constater que le moût de bière était un substrat peu favorable à ces mesures, étant donné sa densité optique trop prononcée, qui ne permet pas l'enregistrement graphique sur toute la largeur de la bande.

TABLEAU N° 2

Etablissement de la gamme expérimentale avec le milieu au moût de bière

Réactifs en ml	Fioles n°					
	1	2	3	4	5	6
Moût de bière	10,0	8,0	9,0	9,5	9,75	9,25
Culture	0,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,25
Solution Biostimuline	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,50

C'est pour cette raison que nous avons effectué les nouvelles expériences en remplaçant le moût de bière par notre milieu synthétique au pantothénate. Les fiolesensemencées sont placées pendant 7 heures dans le biophotomètre au repos, jusqu'à l'amorcement de la croissance des levures. A ce moment, on met l'appareil en marche et on procède à la lecture. Dans cet essai, nous avons fait les constatations suivantes :

Fiole n° 1 (témoin) : absorption inchangée, se traduisant par une droite.

Fiole n° 2 : croissance optimale rapidement atteinte, à partir de la 4^e heure de l'expérience, le degré d'absorption restant stable et diminuant ensuite, par suite des phénomènes d'autolyse.

Fioles n°s 3-4-5 : croissance lente et progressive, en courbes sensiblement parallèles pendant les 24 heures d'observation.

Fiole n° 6 : Amorcement de la croissance plus rapide, la courbe évolue pendant 15 heures à une certaine distance des trois précédentes, mais après 18 heures l'optimum de croissance semble atteint et la courbe devient parallèle aux autres.

Nous avons ensuite fait un nouvel essai en remplaçant le moût de bière par le milieu synthétique au pantothénate et en y ajoutant 1 ml de solution de Biostimulines :

TABLEAU N° 3

Etablissement de la gamme expérimentale avec le milieu au pantothénate

Réactifs en ml	Fioles n°					
	1	2	3	4	5	6
Milieu au pantothénate ...	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Culture	0,1	0,05	0,025	0,1	0,05	0,025
Solution de Biostimulines ..				1,0	1,0	1,0
Eau distillée	1,0	1,0	1,0			

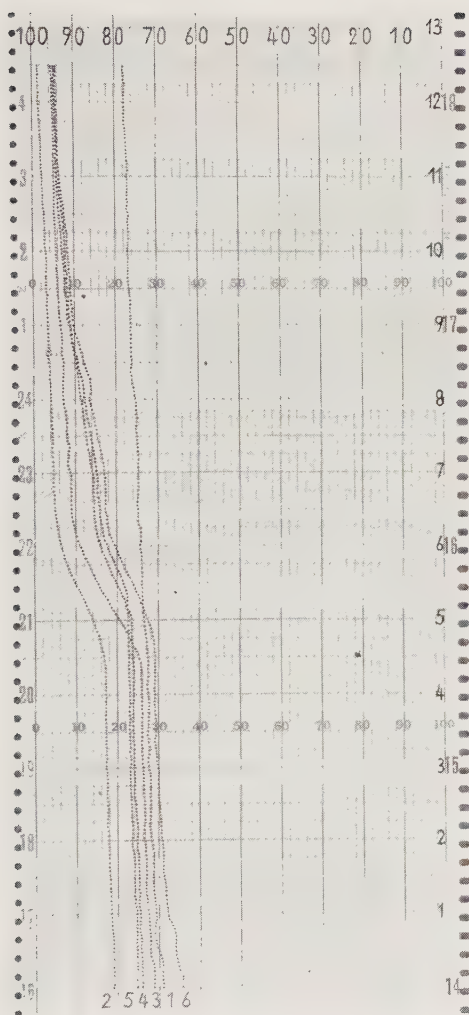


Fig. n° 8. — Courbes biophotométriques
obtenues avec *Hansenula anomala*, inapte au dosage des facteurs biogènes

En comparant les courbes de croissance, nous avons constaté que les courbes concernant les milieux témoins et ceux contenant la Biostimuline évoluent sensiblement en parallèle et en rapport direct avec le taux d'inoculat ensémené.

Ces expériences nous ont montré que *Proteus X-19* et *Hansenula anomala* sont des germes aptes à engendrer leurs propres facteurs de croissance et ne peuvent par conséquent pas être employés comme organismes-test dans nos essais. Par la suite, nous n'avons donc plus employé que *Zymomonas*

mobile qui était le seul germe, à notre connaissance, nécessitant pour sa croissance l'introduction de Biostimulines hétérogènes dans le milieu de culture.

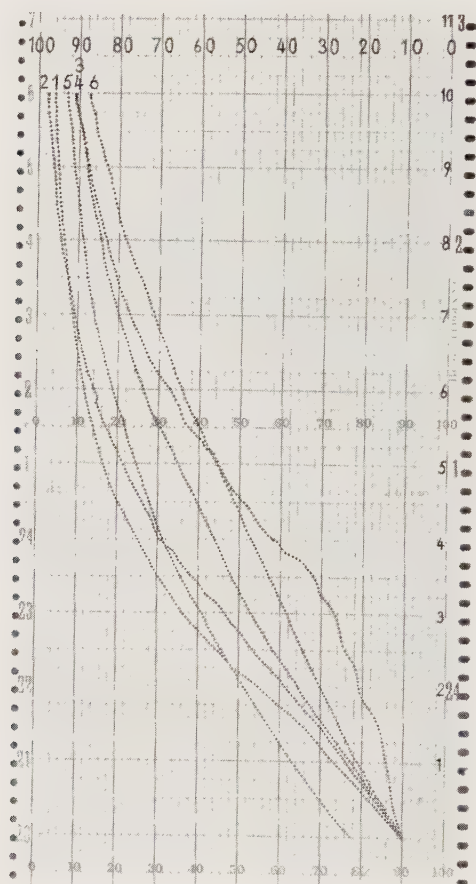


Fig. n° 9. — Courbes biophotométriques obtenues avec *Zymomonas mobile*, spécifique pour le dosage des facteurs biogènes

Essai de caractérisation des Biostimulines végétales

Dans la partie historique de notre travail nous avons vu que nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques des Biostimulines sont encore très précaires. Au point de vue fonctionnel, on ne sait pas encore si elles sont des enzymes, des coenzymes, des vitamines, des provitamines, des hormones ou des métabolites encore inconnus.

Tout ce qu'on sait actuellement, c'est que ces facteurs biogènes sont thermorésistants, on peut donc les stériliser sans inconvénient ; hydro-solubles, ils sont insolubles dans les solvants organiques. Nous avons donc tout d'abord jugé nécessaire de faire une analyse élémentaire des Biostimulines que nous avons préparées à partir de germes de céréales. Les résultats suivants ont été obtenus :

TABLEAU n° 4

Analyse élémentaire de divers échantillons de Biostimulines

Echantillon de Biostimulines n°	Azote (selon DUMAS)	Carbone (selon PREGL)	Hydrogène (selon PREGL)	Oxygène (selon UNTERZAUCHER)
	%	%	%	%
1	0,37	1,45	10,73	88,44
2	1,06	1,56	10,47	88,35
3	0,00	1,71	10,53	88,59
4	0,00	1,68	10,52	88,62

L'échantillon n° 4 était une préparation déshydratée, tandis que les trois autres échantillons étaient des solutions de Biostimulines. Tous les dosages ont été effectués en double et les résultats étaient toujours concordants. Nous supposons que les faibles traces d'azote proviennent d'impuretés d'origine végétale. A première vue on pourrait admettre, d'après ces résultats de l'analyse élémentaire qu'il s'agit de polysaccharides. Cette hypothèse est renforcée par la solubilité dans l'eau et la thermorésistance.

Détermination des doses limites d'activité des Biostimulines

Avant de poursuivre nos expériences sur la composition des Biostimulines, nous avons jugé nécessaire de déterminer les doses limites dans lesquelles l'amorcement des cultures était stimulé. Nous avons mis ensuite au point la technique de repiquage de *Zymomonas mobile*, de façon à éliminer les traces de Biostimulines hétérogènes éventuellement apportées par l'inoculat de départ, provenant d'une culture en moût de bière. Nous avons préparé des tubes de culture contenant 12 ml de milieu au pantothénate qui ont été ensemencés avec des quantités décroissantes d'inoculat :

TABLEAU N° 5

Mesure du pouvoir gazogène de Zymomonas mobile en rapport avec la dose d'inoculat

Tube n°	Inoculat (gouttes)	Maximum de dégagement de CO ₂ après :
1	20	36 heures
2	10	48 heures
3	5	50 heures
4	3	65 heures

Il ressort de cet essai que la concentration optimale pour assurer le départ de la culture est constituée par 20 gouttes d'inoculat en moût de bière. Un essai parallèle nous a donné les mêmes valeurs ; nous en donnons ci-dessous le protocole et les résultats :

TABLEAU N° 6

Deuxième mesure du pouvoir gazogène par rapport à la dose d'inoculat (ml de CO₂)

Lecture après :	Tubes n°			
	1 (5 gouttes)	2 (10 gouttes)	3 (15 gouttes)	4 (20 gouttes)
24 heures	0,0	0,0	0,05	0,4
26 heures	0,0	0,0	0,05	1,4
29 heures	0,0	0,0	0,10	1,5
32 heures	0,0	0,05	0,2	
48 heures	0,0	0,9	1,4	
50 heures	0,0	1,3	1,5	
53 heures	0,0	1,5		
56 heures	0,05			
72 heures	1,5			

Essais à l'aide de nouvelles préparations de Biostimulines

Nous avons à notre disposition quatre autres préparations de Biostimulines végétales présentées sous forme de poudre déshydratée mélangée à du lactose et dont nous rapportons ci-dessous les caractères physico-chimiques. A ce sujet, nous avons employé l'échantillon « V » qui nous avait donné, comme on le verra plus loin, les meilleurs résultats :

Nous avons tout d'abord tenté de caractériser dans ces préparations la présence de substances réductrices : Une solution de Biostimulines V traitée par la liqueur de Fehling a donné une réaction positive.

Une solution de Biostimulines filtrée et diluée à 1/10 avec de l'eau a été portée à ébullition pendant 10 minutes. Après filtration, la réaction de Fehling était toujours positive.

A titre de comparaison, nous avons examiné un échantillon de Biostimulines à l'état liquide et datant de 1963 ; ici aussi la réaction de Fehling était positive. Dans les trois échantillons examinés il existe par conséquent des substances réductrices qui, pour les deux premiers pouvaient provenir du lactose surajouté ; cependant, étant donné que le troisième échantillon donnait le même résultat, on peut admettre que ces glucides pouvaient être amenés par la matière première végétale, à moins que les Biostimulines aient elles-mêmes un pouvoir réducteur.

Nous avons ensuite étudié la solubilité dans l'eau de la Biostimuline V. Pour ce faire un gramme de produit était introduit dans 20 ml d'eau distillée, le tout chauffé à ébullition pendant 10 minutes ; après refroidissement, on filtrait. Le filtrat obtenu est limpide au début, mais devient trouble et visqueux au bout de deux jours, ce qui pourrait être dû à la présence d'amidon. Pour éviter ce phénomène, nous avons dissous 1 g de Biostimulines V dans 20 ml d'eau ; le tout était chauffé au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Après un refroidissement pendant 5 heures, on filtre. Le filtrat limpide était ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 2 500 t/mn. Après décantation, le liquide ainsi obtenu reste limpide et ne devient plus visqueux. Il fallait maintenant examiner si les Biostimulines étaient passées dans cette solution. A cet effet, nous avons effectué l'expérience suivante au moyen du biophotomètre :

Fiole n° 1 : 15 ml de milieu au pantothénate stérile (témoin).

Fiole n° 2 : 15 ml de milieu au pantothénate + 10 gouttes de suspension de *Zymomonas* (1^{re} subculture).

Fiole n° 3 : 5 ml de milieu + 10 gouttes de *Zymomonas* + 5 ml d'eau distillée contenant 0,2 g de Biostimuline V solide + 5 ml de milieu au pantothénate à double concentration.

Fiole n° 4 : 5 ml de milieu + 10 gouttes de *Zymomonas* + 5 ml de solution de Biostimulines comme ci-dessus, chauffée pendant 10 minutes au bain-marie bouillant, filtrée à chaud + 5 ml de milieu en pantothénate à double concentration.

Fiole n° 5 : Comme la fiole n° 4.

Fiole n° 6 : 5 ml de milieu + 10 gouttes de *Zymomonas* + 5 ml de solution de Biostimulines comme ci-dessus, chauffée pendant 10 minutes au bain-marie bouillant, mais filtrée à froid + 5 ml de milieu au pantothénate à double concentration.

Aussitôt après l'ensemencement, les fioles sont portées dans le biophotomètre et les mesures commencent. Ces essais nous ont permis de constater que l'activité des Biostimulines reste sensiblement identique avant et après filtration, c'est-à-dire qu'elles sont hydrosolubles.

Nous avons ensuite examiné l'activité de trois autres Biostimulines (A, B et C) par rapport à celle de la Biostimuline V. Nous avons donc préparé

les six fioles du biophotomètre comme précédemment, la fiole n° 1 contenant le milieu au pantothénate stérile servant de témoin ; la fiole n° 2 contient 15 ml de milieuensemencé par 10 gouttes de *Zymomonas mobile* en moût de bière ; la fiole n° 3 contient le milieu au pantothénate, l'inoculat + 5 ml d'une solution aqueuse à 5 % de Biostimuline V (= 0,25 g de produit). Les trois dernières fioles contiennent respectivement 0,2 g de Biostimuline A, B et C à l'état de poudre, puis on ajoute le milieu au pantothénate. Les fioles sont stérilisées à 110 °C pendant 10 minutes, puisensemencées après refroidissement. Nous exprimons les valeurs biophotométriques lues après 16 heures de culture :

N° 1. — Témoin stérile	0 mAmp
N° 2. — Témoinensemencé	8 mAmp
N° 3. — Biostimuline V	10 mAmp
N° 4. — Biostimuline A	9 mAmp
N° 5. — Biostimuline B	16 mAmp
N° 6. — Biostimuline C	33 mAmp

Dans ces essais, l'activité optimale est produite par la solution de Biostimuline C. Il faut remarquer que le résultat enregistré pour la Biostimuline V est moins favorable, peut-être parce que la dose introduite était trop forte, ce qui entraîne probablement une action frénatrice, comme nous allons le constater plus loin.

Nous avons encore à notre disposition trois autres échantillons de Biostimulines : F 001, F 002 et F 004, que nous avons examinés par rapport à l'échantillon V. Ces quatre préparations se différenciaient par les méthodes de purification employées au cours de leur fabrication. En effet, afin d'éliminer certains ions métalliques, elles avaient été filtrées à travers une couche de différentes résines anioniques et cationiques.

Ces expériences étaient effectuées par la méthode gazométrique, en amenant le volume des tubes de culture à 12 ml de milieu au pantothénate et l'inoculat de première subculture était de 20 gouttes. Au cours des premières 24 heures aucun dégagement gazeux ne s'est manifesté. Dans le tableau suivant, nous ne tenons pas compte des tubes témoins, dont le dégagement gazeux maximum est obtenu au bout de 4 jours de culture, alors que le premier signe de croissance s'est manifesté après 56 heures.

TABEAU N° 7

Mesure du dégagement gazeux (en ml) de doses croissantes de diverses Biostimulines

Lecture après : heures	ECHANTILLONS											
	F 001				F 002				F 004			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,07	0,07	0,0	0,0
50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,05	0,05	0,0	0,2	0,1	0,07	0,05
53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,05	0,0	0,4	0,15	0,07	0,05
56	0,05	0,0	0,0	0,0	1,1	0,3	0,05	0,0	0,7	0,3	0,1	0,05
72	0,2	0,05	0,0	0,0	1,5	1,4	0,5	0,0	1,5	1,3	0,6	0,2
74	0,35	0,1	0,05	0,0		1,5	0,8	0,0		1,5	0,9	0,2
77	0,5	0,3	0,05	0,0			1,1	0,0			1,1	0,3
80	0,8	0,5	0,05	0,05			1,4	0,05			1,3	0,35
96	1,5	1,5	0,15	0,05			1,5	0,3			1,5	1,4
98			0,2	0,05				0,3				1,5
101			0,3	0,05				0,4				
104			0,4	0,05				0,5				
120			1,5	0,7				1,5				
122				0,9								
125				1,3								
128				1,5								

De cette expérience nous pouvons conclure que la préparation F 002 était la plus active, immédiatement suivie de la Biostimuline F 004. D'autre part, on remarque que les doses faibles de Biostimulines donnent des résultats plus favorables et plus rapides que des concentrations plus fortes. En effet, dans notre tableau, les concentrations étaient réparties comme suit :

Tube n° 1 = 0,25 g de Biostimulines

Tube n° 2 = 0,50 g de Biostimulines

Tube n° 3 = 1,00 g de Biostimulines

Tube n° 4 = 2,00 g de Biostimulines

A noter également la nette différence de croissance du *Zymomonas* dans les milieux contenant de la Biostimuline par rapport aux cultures témoins sans facteur biogène.

Nous avons refait une seconde expérience en modifiant légèrement la préparation du mélange réactionnel. En effet, la poudre de Biostimulines était dissoute par ébullition dans chaque fois 6 ml de milieu au pantothénate, puis on ajuste à 12 ml. Après stérilisation des tubes, on ensemence avec 20 gouttes d'inoculat (première subculture). Nous avons obtenu les résultats suivants :

Interprétation

Dans cette expérience également, la Biostimuline F 004 s'est montrée la plus active, suivie de F 002 puis de F 001. Nous avons constaté une fois de plus que des concentrations faibles ont une action biogène nettement supérieure aux concentrations dépassant 1 g pour 12 ml, quel que soit l'échantillon de Biostimuline employé.

La méthode gazométrique a donc montré que 0,25 g de Biostimuline déshydratée dissoute dans 12 ml de milieu au pantothénate présente l'activité biogène optimale. Pour contrôler ces faits, nous avons effectué une troisième expérience en ayant recours cette fois à l'enregistrement biophotométrique.

Dans ce but nous avons préparé un milieu frais au pantothénate, que nous avons filtré et à 10 ml de ce milieu nous avons ajouté 0,20 g de chacun de nos échantillons de Biostimuline. Les fioles étaient stérilisées à l'autoclave à 120 °C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on ensemait à l'aide d'un inoculat de *Zymomonas mobile* provenant d'une deuxième subculture dans le milieu au pantothénate. Après 12 heures de séjour à l'étuve à 27 °C, nous avons commencé la lecture de l'enregistrement biophotométrique.

Notons tout de suite que le témoin stérile évolue en ligne droite ; le témoin ensemencé donne la courbe la plus lente et après huit heures, celle-ci évolue à son tour en ligne droite et sa valeur en ordonnée s'enregistre à 79 mAmp.

Les échantillons F 001 et F 002 atteignent le maximum de croissance après 7 h 30 mn, leur valeur biophotométrique est à ce moment de 85 mAmp et elle reste stable par la suite.

L'échantillon F 004 présente une courbe à induction plus rapide qui atteint son maximum après 6 h 30 mn de culture et la valeur biophotométrique s'enregistre à ce moment déjà à 85 mAmp. La courbe rejoint ensuite les deux autres et évolue en ligne droite.

Le meilleur résultat est obtenu avec l'échantillon V ; la courbe accuse un amorcement beaucoup plus rapide que celui obtenu avec les autres échantillons, elle dépasse déjà largement 85 mAmp au bout de seulement 4 heures. Après 8 heures l'optimum de croissance est atteint et la valeur biophotométrique est de 90 mAmp.

Il ressort de cette expérience que l'échantillon V a une activité biogène nettement supérieure aux trois autres. Ce résultat est discordant avec celui de l'expérience gazométrique où nous avons constaté que l'échantillon F 004 présentait une activité plus forte que la préparation V. Nous croyons pouvoir expliquer cette discordance par le fait que les essais gazométriques avaient été effectués avec un inoculat de première subculture, qui aurait pu apporter des Biostimulines hétérogènes provenant du moût de bière, alors que dans la dernière expérience biophotométrique, l'ensemencement était pratiqué avec des germes provenant d'une deuxième subculture, donnant toutes les garanties d'absence de Biostimulines hétérogènes.

Ayant ainsi constaté que l'échantillon V est le plus actif, nous n'avons par la suite employé que lui. Tout d'abord, il nous a semblé indispensable de déterminer la dose optimale de Biostimulines à employer. A ce sujet, nous avons encore eu recours au biophotomètre. Le protocole expérimental était toujours identique et les doses de Biostimulines V employées étaient de : 0,1 g, 0,2 g, 0,4 g, 0,8 g. Chacun de ces échantillons était dissous préalablement par ébullition dans 3 ml de milieu frais au pantothénate, puis on complétait le volume à 10 ml dans chaque fiole. Après stérilisation, on ensemait au moyen d'une deuxième subculture de *Zymomonas mobile* en milieu de pantothénate.

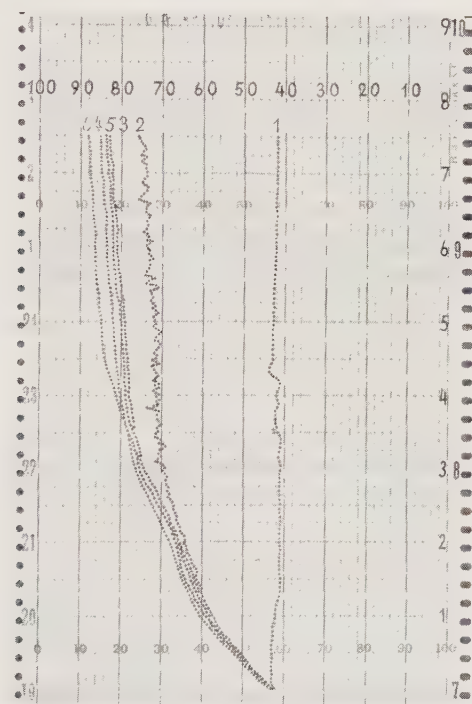


Fig. n° 10. — Courbes biophotométriques démontrant l'action biogène des différents extraits mis à l'épreuve

Cette mesure nous a montré que 0,2 g de Biostimuline sur 10 ml de milieu au pantothénate constituait la concentration optimale pour amorcer et assurer le développement de *Zymomonas mobile*.

Nous avons ensuite effectué une nouvelle expérience biophotométrique pour déterminer la dose optimale d'inoculat à employer dans nos conditions expérimentales. L'ensemencement a été pratiqué avec une deuxième subculture en milieu au pantothénate à raison de : 2, 4, 8, 10 et 16 gouttes.

D'après cet essai, nous pouvons conclure que la concentration optimale d'inoculat est de 10 gouttes d'une deuxième subculture.

Expérience effectuée à l'aide d'une préparation de Biostimuline liquide

Nous avons jugé nécessaire de mettre en expérience une Biostimuline liquide préparée en 1963 pour contrôler d'une part la conservation de son activité biogène et d'autre part pour la comparer à celle des Biostimulines solides récemment préparées.

Les courbes enregistrées au biophotomètre nous ont montré que 15 gouttes de Biostimuline liquide dans 10 ml de milieu au pantothénate avaient une activité comparable à celle de 10 gouttes d'une dilution de 0,2 g/10 ml de Biostimuline V. On peut donc dire que la conservation du produit est satisfaisante.

Etant donné que le produit déshydraté est obtenu en mélangeant kilogramme/kilogramme de Biostimuline liquide et de lactose, on peut conclure que 15 gouttes de l'extrait liquide conservé présentent une activité biogène comparable à celle obtenue avec 0,01 g de produit déshydraté récemment préparé.

Essais préliminaires de caractérisation des Biostimulines par spectrophotométrie et chromatographie

Spectrophotométrie

Nous avons utilisé le *spectrophotomètre* de BECKMANN pour la mesure dans l'ultraviolet. Nous avons dissous à chaud 1 g de Biostimuline V dans 200 ml d'eau distillée ; après refroidissement, on filtre. Les glucides contenus dans la solution n'influent pas sur la mesure spectrophotométrique, puisqu'ils ne montrent pas d'absorption dans l'ultraviolet. La courbe spectrophotométrique révèle une absorption à environ 265 m μ .

Pour obtenir un résultat plus probant, nous avons refait la même expérience en diluant au 1/10 notre solution précédente. Dans ces conditions, nous avons constaté que le maximum d'absorption se situe entre 248 m μ et 265 m μ .

Nous donnons ci-après le graphique de la courbe spectrophotométrique.

Ces constatations nous permettent d'émettre l'hypothèse de la possibilité d'isoler les Biostimulines par chromatographie sur colonne, en cherchant à déterminer la fraction présentant la même absorption de 250 à 265 m μ environ au spectrophotomètre ultraviolet.

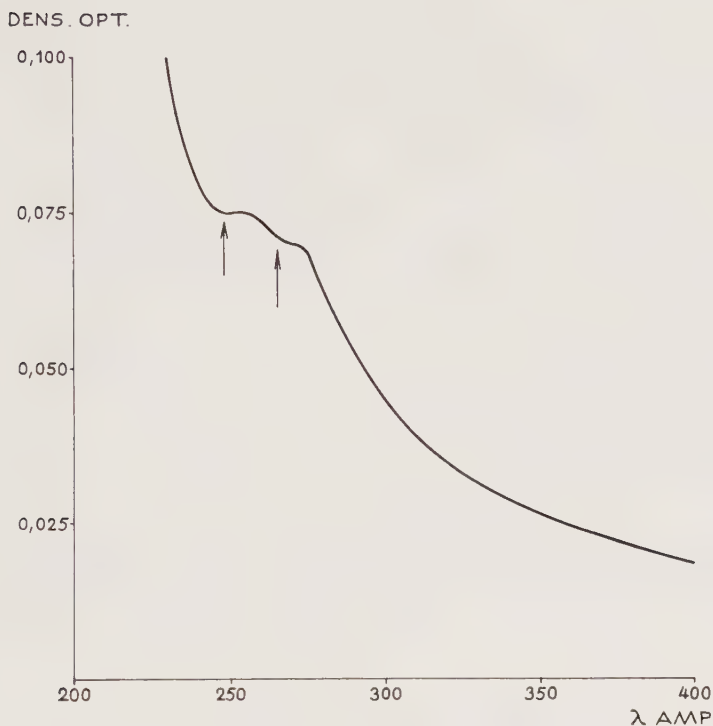


Fig. n° 11. — Spectre photométrique de Biostimuline V

Chromatographie sur papier

Nous avons effectué un essai préliminaire par chromatographie sur papier. Nous avons dissous 1 g de Biostimuline V dans 20 ml d'eau et comme témoin nous avons eu recours à une solution aqueuse de lactose à 1/20.

On dépose suivant un trait à 2 cm du bas du papier et 3 cm du bord latéral de ce dernier, 0,05 ml de la solution de Biostimuline. A 3 cm de ce point, on dépose 0,05 ml de la solution témoin. On sèche les points de dépôt à l'aide d'un courant d'air chaud. Comme solvant de migration, nous avons utilisé le mélange suivant :

Acétate d'éthyle	20 g
Pyridine	10 g
Eau distillée	20 g

On plonge la partie inférieure du papier filtre dans le solvant, on ferme hermétiquement la cloche. Après 5 heures de migration, on arrête l'opération, on sèche et on révèle à l'aide d'une solution à parties égales de nitrate d'argent 0,1 N et d'ammoniaque 5 N. On sèche le chromatogramme pendant 5 minutes à 105 °C.

Le front de migration était identique pour la Biostimuline et pour le lactose et on notait des taches d'un brun noirâtre dont le Rf était de 0,26.

Nous avons ensuite tenté de caractériser le lactose et éventuellement la Biostimuline en employant comme révélateur une solution aqueuse à 2 % de *chlorure de triphényltétrazolium* et une solution de NaOH N à parties égales. L'excès de réactif a été éliminé par lavage précautionneux à l'eau distillée et le chromatogramme était séché à la température du laboratoire. Dans ce cas, les Rf du lactose et de la Biostimuline étaient de nouveau identiques et les deux produits se caractérisaient par une tache d'un rouge vif, pâlisant avec le temps. Cependant, la tache correspondant à la Biostimuline était divisée en deux fractions.

Un troisième chromatogramme a été révélé avec une solution de ninhydrine, mais dans ce cas également, le lactose et la Biostimuline se localisaient au même Rf, caractérisés par des taches rouges.

Chromatographie en couche mince

Nous avons effectué un premier essai en utilisant un mélange de polysaccharides avec des oses connues. La chromatographie en couche mince a été pratiquée suivant la technique de STAHL (24). Le solvant de migration était constitué ainsi :

Butanol	40 g
Acétone	50 g
Solution aqueuse à 1 % d'acide borique	10 g

Le temps de migration était de 1 h 30 ; comme révélateur nous avons employé un mélange à parties égales d'une solution à 1 % de permanganate de potasse et d'une solution aqueuse à 2 % de carbonate de sodium. Après pulvérisation, on place la plaque pendant 5 minutes à 100 °C. On constate alors l'apparition de taches brunes sur fond violet.

Cette expérience nous a montré que notre Biostimuline ne contenait ni saccharose, ni maltose, ni glucose, ni levulose, ni galactose. Le seul sucre révélé était le lactose, évidemment présent. Aucune tache spéciale ne se manifestait pour la Biostimuline.

Un deuxième essai était effectué en déposant sur la plaque du lactose et des doses croissantes de Biostimuline. Comme solvant de migration, nous avons employé le mélange précédent (butanol-acétone-acide borique). Le révélateur était constitué par une *solution de thiocyanate de cobalt dans l'ammoniaque*. Après vaporisation, on chauffait à 100 °C pendant 10 minutes. Les taches de sucre apparaissaient alors en brun sur fond bleu. Le résultat était de nouveau identique et aucune caractérisation de la Biostimuline n'était possible.

Dans un troisième essai, nous avons employé le même solvant de migration que précédemment et comme révélateur, une solution à 0,5 % de *Rhodamine B* dans l'alcool absolu. Il se formait des taches rouges, localisées au même Rf pour le lactose et la Biostimuline.

Dans l'épreuve suivante, nous avons employé comme solvant de migration de l'eau distillée et le révélateur était constitué par une solution à 5 % d'acide sulfurique concentré dans l'alcool absolu. On chauffait à 100 °C pendant 5 minutes après quoi le lactose et la Biostimuline se manifestaient par l'apparition de taches d'un brun noirâtre sur fond blanc.

Une cinquième expérience a été tentée au moyen du solvant de migration constitué par de l'acide acétique et de l'acétone en parties égales. Nous avons préparé deux plaques dont l'une a été révélée au moyen d'acide sulfurique + alcool et l'autre au moyen de thiocyanate de cobalt + ammoniac. La mise en évidence des Biostimulines était impossible sur les deux plaques, où le lactose seul était caractérisé.

Un dernier essai a été effectué pour détecter éventuellement la présence d'acides aminés. A ce sujet, nous avons employé comme solvant de migration un mélange à parties égales d'acide acétique et d'acétone et le chromatogramme était révélé au moyen d'une solution de 0,3 g de ninhydrine dans 100 ml de butanol + 3 ml d'acide acétique cristallisable. Là aussi, les Rf du lactose et de la Biostimuline étaient au même niveau et présentaient une tache rouge.

L'ensemble de ces expériences prouve qu'il est nécessaire d'éliminer le lactose, support principal de la Biostimuline V, avant d'essayer de caractériser celle-ci.

CHAPITRE IV

ESSAI D'ISOLEMENT DES FACTEURS BIOGÈNES DANS NOS EXTRAITS VÉGÉTAUX

Le but essentiel de notre travail était d'isoler, dans la mesure du possible, les facteurs de croissance contenus dans nos extraits végétaux et d'essayer d'élucider leur composition chimique et de caractériser les fractions actives sur la croissance des microorganismes en général et sur *Zymomonas mobile* en particulier.

Etant donné les progrès faits au cours des dernières 30 années dans l'investigation des différents composants de substrats naturels, grâce aux techniques chromatographiques et électrophorétiques, nous avons eu recours à ces méthodes dans nos recherches.

En ce qui concerne la chromatographie, nous avons vu dans la partie historique de notre travail qu'il existe trois méthodes différentes : la chromatographie sur papier filtre, en couche mince et sur colonne. Nous avons principalement eu recours à la chromatographie en couche mince, puisqu'elle présente l'avantage d'être plus rapide et d'utiliser des réactifs plus brutaux comme révélateurs. On peut ainsi mettre en évidence des substances dont on ne connaît pas la structure chimique et ceci en employant des réactifs universels tels qu'une solution de permanganate de potasse dans l'acide sulfurique concentré, ou même de l'acide sulfurique seul.

Nos essais ont été tout d'abord effectués au moyen de Biostimulines déshydratées déjà employées dans nos expériences préliminaires. Comme nous l'avons vu, ces Biostimulines déshydratées avaient comme support du lactose, c'est pourquoi toutes nos expériences ont été pratiquées avec des solutions témoins de lactose. A cet effet, on dissout dans le bain-marie bouillant pendant 10 minutes, d'une part 2 g de Biostimuline déshydratée dans 10 ml d'eau distillée, et d'autre part 2 g de lactose dans 10 ml d'eau distillée. Pour étudier la constitution chimique de ces facteurs biogènes nous avons, de plus, hydrolysé à la fois la solution de Biostimuline et celle de lactose. A ce sujet, on introduit dans des tubes en verre fusible les deux produits à examiner, on y ajoute la quantité nécessaire d'acide chlorhydrique, on soude les tubes au chalumeau et les ampoules ainsi préparées sont disposées pendant 18 heures à 100 °C. Après refroidissement, on ouvre les ampoules et leur contenu est centrifugé, de même d'ailleurs que les substrats non hydrolysés préparés antérieurement. Le centrifugat est

filtré sur papier pour obtenir des solutions parfaitement limpides. Les solutions hydrolysées présentaient dans ces conditions, une coloration brun foncé, tandis que les solutions naturelles étaient jaune pâle. Les quatre solutions ainsi préparées ont été soumises à la chromatographie en couche mince.

Expériences proprement dites

A ce sujet, nous avons déposé sur les plaques chromatographiques des doses décroissantes de chacune des quatre solutions. Le solvant de migration était constitué par :

Acétate d'éthyle	20 g
Eau distillée	10 g
n-propanol	10 g

Après un temps de migration d'une heure, on évaporait le solvant et on révélait les chromatogrammes au moyen du mélange permanganate de potasse + acide sulfurique concentré. On note ainsi l'apparition de taches blanches sur fond violet. Dans le tableau ci-dessous nous exprimons les résultats obtenus en donnant, selon les conventions établies en chromatographie, les valeurs Rf multipliées par 100.

TABLEAU N° 9

Valeurs Rf de la Biostimuline et du lactose hydrolysés et non hydrolysés

Doses de substrat employées μl	Valeurs de Rf × 100 trouvées			
	Biostimuline		Lactose	
	hydrolysée	non hydrolysée	hydrolysé	non hydrolysé
10	25	27	25	27
5	25	27	25	27
2	25	27	25	27

Interprétation

Notons tout d'abord que la grandeur et l'intensité des taches diminuaient en rapport direct avec les doses de solution déposées. Les solutions hydrolysées présentent une tache avec une traînée floue dirigée vers le haut, alors que dans les solutions non hydrolysées, cette traînée se dirige vers le bas. A part cela, les taches sont identiques d'aspect et de Rf pour les quatre solutions mises en œuvre. Par l'hydrolyse le lactose est dédoublé en glucose et galactose, mais comme les Rf de ces deux substances ne varient que de 1, leurs taches se confondent. Devant ce résultat décevant, on peut supposer que le solvant de migration est inapte à entraîner d'autres

substances, ou que la concentration en lactose est trop forte, de sorte qu'il masque les autres composants présents sans doute à des concentrations beaucoup plus faibles, si faibles même qu'elles peuvent se situer en dehors des limites de sensibilité chromatographique.

Un deuxième essai a eu recours à un autre solvant de migration :

Acétate d'éthyle	20 g
Pyridine	10 g
Eau distillée	20 g

Le temps de migration était de trois heures et le chromatogramme fut de nouveau révélé par la solution de permanganate de potasse + acide sulfurique concentré. Les Biostimulines hydrolysées et le lactose hydrolysé donnent de nouveau des taches au même $R_f = 5$, tandis que les produits non hydrolysés n'ont pas migré du tout.

Nous avons tenté un troisième essai en changeant une fois de plus le solvant de migration :

n-propanol	85 g
Ammoniaque à 25 %	5 g
Eau distillée	10 g

Le temps de migration est de deux heures trente et le révélateur est toujours la solution de permanganate de potasse + acide sulfurique concentré. Ici aussi les résultats furent décevants et ne montraient que les taches du lactose.

Un résultat positif a été obtenu en effectuant un chromatogramme identique au précédent, mais en employant comme révélateur une solution de

Ninhydrine	0,3 g
Butanol	100,0 ml
Acide acétique crist.	3,0 ml

Comme on le sait, il s'agit là d'un révélateur des acides aminés. Les plaques chromatographiques sont disposées à 100 °C pendant 10 minutes. A ce moment on constate l'apparition de traînées non localisables, de couleur rouge bleuâtre. Ici aussi, le lactose présente encore les mêmes inconvénients pour la lecture. Nous avons tenté de l'éliminer successivement par recristallisation, centrifugation, filtration à travers une colonne d'oxyde d'alumine active. Mais après toutes ces tentatives, le lactose empêchait toujours l'identification d'autres substances. C'est pour cette raison que nous avons décidé de reprendre ces expériences à l'aide de la Biostimuline en solution datant de 1961.

Nous avons effectué un chromatogramme en employant comme solvant de migration :

Isopropanol	80 g
Ammoniaque à 34 %	10 g
Eau distillée	10 g

On laisse migrer le temps nécessaire pour que le front du solvant atteigne 10 cm de hauteur. Le révélateur est constitué par la solution de ninhydrine ; on chauffe à 100 °C pendant 10 minutes. On note alors l'apparition de quelques taches d'un bleu très pâle.

A la suite de ce résultat, nous avons concentré 30 ml de notre Biostimuline liquide à 3 ml dans un vide de 10 mm de Hg à l'aide d'un appareil rotatif. La solution ainsi obtenue est légèrement trouble ; en poussant plus loin la concentration, on obtient un précipité fin et cristallisé, qui peut être remis en solution dans l'eau. Si l'on ajoute aux 3 ml de solution concentrée une quantité suffisante d'alcool, on obtient un précipité blanc insoluble dans l'eau.

Après ces constatations, nous avons évaporé 100 ml de Biostimuline liquide à 10 ml, qui ont été utilisés pour pratiquer une chromatographie en couche mince. Pour ce faire nous déposons sur la plaque chaque fois 10 µl du concentré à l'aide d'une micropipette. Le solvant de migration était de nouveau le réactif isopropanol + ammoniac + eau. Après migration sur 10 cm de hauteur, la plaque séchée à l'étuve était vaporisée avec le révélateur à la ninhydrine, puis placée pendant 10 minutes à 100 °C. Nous avons noté l'apparition de taches rouges, violettes et bleues, prouvant ainsi la présence d'acides aminés dans la Biostimuline liquide.

L'identification des différentes taches plus ou moins confluentes n'étant pas possible par la détermination des valeurs Rf, nous avons dû avoir recours à différentes autres méthodes : chromatographie en couche mince bidimensionnelle, chromatographie sur papier, électrophorèse sur papier et, finalement, la combinaison de ces deux dernières méthodes.

Dans la *chromatographie bidimensionnelle*, STAHL ainsi que RANDERATH (25) recommandent d'employer pour la détermination des acides aminés, comme solvant de la première phase, le mélange suivant :

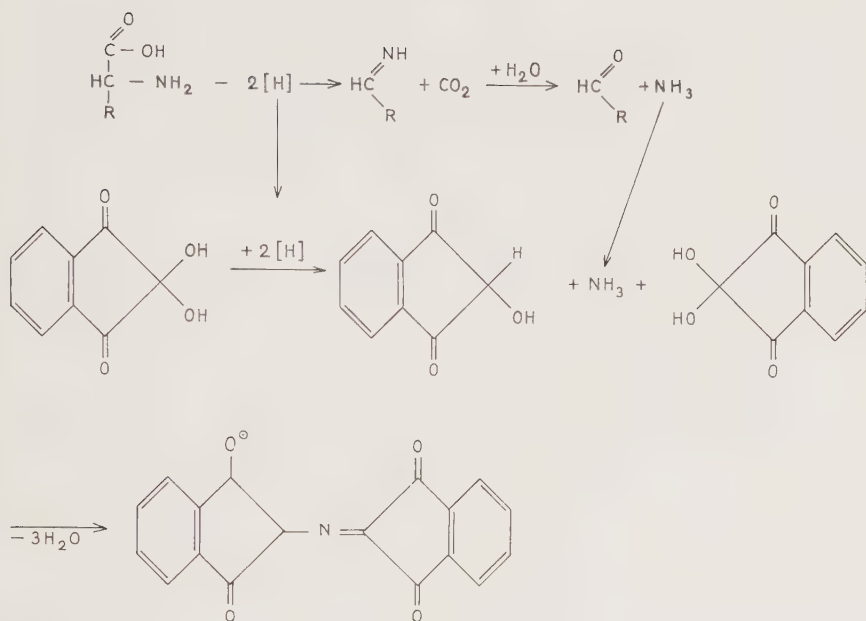
Chloroforme	20 g
Méthanol	20 g
Ammoniac à 17 %	10 g

et pour la deuxième phase :

Phénol	75 g
Eau distillée	25 g

Le premier solvant de migration est à réaction alcaline et permet de séparer les acides aminés acides, tandis que le second est à réaction acide et est favorable surtout à la détermination des acides aminés basiques.

Le meilleur réactif d'identification des acides aminés est la ninhydrine, qui évolue d'après le schéma suivant :



Comme on le constate, l'acide-amino est tout d'abord dégradé en *aldéhyde* immédiatement inférieur et en *anhydride carbonique*. Le colorant bleu qui apparaît se forme à partir des réactifs et de l'ammoniaque libérée par la réaction et est constitué par des doubles combinaisons conjuguées qui, par l'absorption de lumière, font apparaître en lumière naturelle la teinte bleue.

Pour cette chromatographie bidimensionnelle, on dépose dans le coin inférieur gauche une gouttelette de Biostimuline à examiner ; on place la plaque dans la cloche de chromatographie et on laisse migrer sur une hauteur de 10 cm, ce qui demande environ une heure et demie. On sèche la plaque, et pour pratiquer la deuxième phase, on emploie le solvant phénol + eau auquel on ajoute 20 mg % de cyanure de sodium comme anti-oxydant. La migration sur 10 cm dans cette deuxième dimension demande environ 3 h 30 mn. L'élimination de l'excès de phénol est obtenue par chauffage à environ 90 °C, après quoi on vaporise le chromatogramme avec la solution de ninhydrine, puis on chauffe pour sécher la plaque et révéler les taches. Nous avons pu identifier ainsi 10 taches nettement séparées. Une de ces taches est jaune, ce qui caractérise la Proline, toutes les autres sont rouges ou violettes. Nous avons effectué six réactions identiques pour déterminer les valeurs Rf moyennes qui sont les suivantes :

Premier solvant de migration : 17 27 31 35 36 37 46 51 55 59 ;

Deuxième solvant de migration : 23 16 29 48 24 21 33 43 56 74.

La Proline possède dans nos conditions expérimentales les Rf 35/48 : d'après RANDERATH, ces valeurs devraient être de 37/50, ce qui semble sensiblement concordant.

Les neuf taches colorées en bleu sont plus difficiles à interpréter, car dans nos différentes expériences les R_f variaient sensiblement ; cependant, les valeurs moyennes de R_f nous permettent de supposer la présence de *Glycocolle*, d'*Acide glutamique*, d'*Acide aspartique* et probablement de *Tryptophane*. Pour solutionner ce problème nous avons procédé à une nouvelle expérience à l'aide de la chromatographie sur papier.



Fig. n° 12. — Chromatographie prouvant la présence de 10 amino-acides dans la Biostimuline en expérience

Caractérisation des acides aminés par électrophorèse et chromatographie

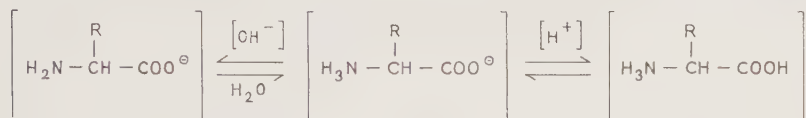
Etant donné que dans nos expériences précédentes nous avons pu constater la présence de 10 acides aminés dont nous n'avons pu déterminer avec précision que la Proline, nous avons jugé nécessaire d'avoir recours à une méthode combinée d'électrophorèse et de chromatographie.

On sait que les acides aminés peuvent être tour à tour anion et cation. Si nous soumettons ces molécules à un champ électrique, il est aisé de comprendre que :

- Au pH isoélectrique, la molécule a une mobilité nulle, puisqu'elle n'est pas chargée ;
- En milieu très acide, elle migre vers la cathode ;
- En milieu très alcalin, elle migre vers l'anode.

Ainsi le groupe carboxyle peut, comme groupe acide d'ion H^- , se dissocier tandis que l'aminogroupe alcalin absorbe les ions H^+ , en analogie, par exemple avec l'ammoniaque $NH_3 + H^+ = NH_4$. Si les deux groupes

sont dissociés, on obtient un sel interne, forme principale des acides aminés libres. Nous exprimons ces résultats dans le schéma suivant :



Les sels internes sont donc des molécules à ions dipoliques, portant par conséquent deux charges électriques opposées. C'est pour ces raisons que dans l'électrophorèse, les solutions-tampons acides ou alcalines ont une grande importance.

La direction de la migration et sa rapidité dans le champ électrique dépendent par conséquent du pH de la solution. Le pH optimal pour l'électrophorèse des amino-acides est de 3,9. La solution-tampon répondant le mieux à cette condition est composée de :

Pyridine	6 ml
Acide acétique cristallisé	20 ml
Eau distillée q.s.p.	1 000 ml

On sait que l'électrophorèse peut être effectuée soit sur colonne, soit en couche mince de gel ou sur papier. Nous nous sommes adressé à l'électrophorèse sur papier, puisqu'elle constitue la méthode la plus simple pour l'analyse qualitative.

L'appareillage de l'électrophorèse sur papier est constitué de deux vases à électrodes, dont les extrémités sont reliées par un bac en plexiglas. Ces vases servent de réservoirs à la solution-tampon ; ils sont divisés en deux parties par une cloison percée d'un orifice central muni d'un diagramme en coton de verre. Les portions externes reçoivent les électrodes en platine. Le support du papier filtre est d'habitude constitué par un cadre mobile en résine synthétique. Le papier filtre est le plus souvent celui de *Whatman* n° 1, ou celui de *Schleicher et Schull* 2043, ou encore du papier d'*Arches* n° 304.

Ce papier filtre fut découpé en bandes de 27 cm sur 4 cm dans nos premiers essais. Par la suite, nous nous sommes rendu compte que le format 27 cm × 24 cm était plus favorable, puisque nous avons pu soumettre à l'électrophorèse différentes solutions témoins en même temps.

L'ensemble de l'appareil doit constituer une enceinte close, pour éviter toute évaporation du liquide imprégnant le papier. D'autre part, il faut une alimentation en courant redressé. Le générateur de courant continu, réglé de manière qu'il ne puisse varier, permet de réaliser au choix un courant de 100, 200 ou 400 volts et de brancher 18 bandes.

Nous avons travaillé avec 200 volts. La bande de papier doit absorber tout d'abord la solution-tampon, puis on y dépose la solution à étudier en stries au moyen d'une micropipette. Le circuit électrique est alors fermé. Pour révéler les acides aminés par électrophorèse, il est avantageux de

disposer la solution à étudier, non pas au milieu de la bande, mais sur un trait situé à 11,5 cm d'un bord et à 15,5 cm de l'autre, de sorte qu'il se trouve décalé de 2 cm du milieu de la bande, vers la cathode. En opérant dans ces conditions, les acides aminés peuvent être divisés en trois groupes : les amino-acides *neutres* tels que Glycocolle, Proline, Valine, Asparagine, Alanine, Méthionine, Sérine, Phénylalanine, Thréonine, Tryptophane et Leucine. Les acides aminés *acides*, tels l'Acide glutamique, l'Acide aspartique, la Cystéine, qui migrent vers la cathode. Les acides aminés *basiques* tels l'Arginine, l'Histidine, l'Ornithine, la Lysine et l'Acide α -amino-butérique, qui migrent vers l'anode.

Nous avons effectué les électrophorèses suivantes :

Recherche des substances biogènes glucidiques

Notre première expérience était effectuée avec une solution de 2 g de Biostimuline déshydratée, dissous dans 10 ml d'eau distillée, après hydrolyse. Parallèlement, nous avons employé, dans les mêmes conditions, une solution de lactose (2 g dans 10 ml d'eau distillée) non hydrolysée. Les deux solutions ont été déposées sur la même bande de papier filtre. Comme solution-tampon, nous avons utilisé une solution de borate de soude de 0,05 mol. et à pH = 10,0. Ce tampon se prête favorablement à l'électrophorèse des glucides, puisque les sucres migrent très difficilement dans le champ électrique et ils forment avec l'acide borique une combinaison complexe plus favorable à l'électrophorèse. L'électrophorégramme est séché et révélé au moyen d'une solution aqueuse à 2 % de chlorure de triphényltétrazolium et d'une solution de NaOH N à parties égales (v/v). A cet effet, on l'expose dans une cuve saturée de vapeur d'eau et à la température de 40 °C. Dans ces conditions, on voit apparaître des taches rouges ; l'excès de réactif TPT est éliminé en déposant avec précaution l'électrophorégramme dans l'eau, puis on le sèche à la température ambiante. Ces taches rouges apparaissent en présence de sucres réducteurs, transformant le TPT incolore en Formazan rouge ; cette réduction s'effectue au niveau de l'atome C-1 porteur du groupe aldéhyde.

Cette expérience a donné un résultat négatif : nous n'avons pu déceler aucune autre substance glucidique que le lactose servant de support de déshydratation.

Nous avons pratiqué un deuxième essai en employant un autre révélateur, le réactif au *phthalate d'aniline* : On dissout 1,66 g d'acide phthalique et 0,93 g d'aniline dans 100 ml de butanol saturé préalablement d'eau distillée. Après la vaporisation, on chauffe pendant 10 minutes à 105 °C. Les aldopentoses donnent des taches d'un brun rougeâtre à fluorescence rouge, les autres sucres donnent des taches vert-olive à fluorescence jaune. Notre électrophorégramme nous a donné cette dernière réaction, avec une similitude de niveau des taches pour les deux solutions mises en expérience, comme dans l'essai précédent.

Un troisième essai a été pratiqué avec la Biostimuline liquide telle quelle ; l'électrophorégramme était révélé au moyen de la solution de TPT, mais le résultat a été complètement négatif, le taux de substances glucidiques réductrices étant sans doute trop faible.

Recherche des acides aminés

Pour cette première expérience, nous avons employé une bande de papier filtre de 27 cm sur 24 cm, la tension électrique était de 200 volts et la migration s'effectuait durant 5 heures. La solution-tampon était constituée comme précédemment par le mélange Pyridine + acide acétique + eau, de $\text{pH} = 3,9$. Nous avons mis à l'épreuve :

- 1° La Biostimuline liquide ramenée de 10 ml à 1 ml, à la dose de 0,1 μl ;
- 2° Une solution témoin contenant de la β -alanine et du Tryptophane ;
- 3° La Biostimuline liquide concentrée au 1/10 comme dans 1) ;
- 4° Une solution témoin composée d'acide aspartique, d'acide glutamique, de Glycocolle, de β -alanine, d'acide para-aminobutyrique et d'Histidine ;
- 5° Une solution témoin à base d'acide aspartique et d'Histidine.

Il nous a semblé nécessaire d'employer plusieurs mélanges témoins d'acides aminés, puisque certains de ces derniers ont des valeurs R_f très voisines ou nécessitent un autre révélateur.

A cet effet nous avons employé la solution n° 4 composée de six acides aminés qui migrent sur toute l'étendue de l'électrophorégramme. Ainsi, l'*Histidine* se localise à proximité de l'anode tandis que l'*acide aspartique* se trouve tout près de la cathode. Les quatre autres amino-acides ont été choisis intentionnellement, car leur distance de migration est assez étendue. Dans ces conditions, les acides aminés à rechercher dans un substrat peuvent être identifiés par comparaison de leurs R_f avec ceux de ces six témoins.

La solution témoin n° 5 (acide aspartique et Histidine) est nécessaire pour contrôler la bonne position des charges positive et négative par révélation à la ninhydrine qui donne des taches bleues.

La solution témoin n° 2, composée de β -alanine et de Tryptophane, doit compléter la solution témoin n° 4, puisque les deux acides aminés auraient pu chevaucher l'un ou l'autre des acides aminés témoins de cette dernière solution, empêchant ainsi la localisation nette des taches.

Notons que par l'électrophorèse bidimensionnelle on peut caractériser les 10 acides aminés témoins par leur valeur R_f :

<i>Acide aminé</i>	<i>Rf 1^{re} dimension</i>	<i>Rf 2^e dimension</i>
Tryptophane	59	74
Leucine	55	56
Valine	51	43
Histidine	46	33
Acide glutamique	37	21
Glycocolle	36	24
Proline	35	48
β -alanine	31	29
Acide aspartique	27	10
Arginine	17	23

Après vaporisation de la solution de ninhydrine, on sèche l'électrophorégramme à 100 °C. Notons que le réactif de ninhydrine a été modifié d'après les données de PHILLIPS (26) pour obtenir une durée de conservation plus longue des taches colorées. Le réactif est préparé de la façon suivante :

Solution de nitrate de cuivre saturée	1 ml
Acide nitrique à 10 %	0,2 ml
Méthanol à 95°, q.s.p.	100,0 ml

On vaporise ce réactif sur les taches révélées par la ninhydrine ; il se forme un complexe de cuivre-ninhydrine durable, surtout si l'on expose l'électrophorégramme aux vapeurs d'ammoniaque.

Ce premier essai nous a permis de caractériser dans notre Biostimuline les acides aminés suivants : Glycocolle, Acide glutamique, Acide aspartique et très probablement aussi l'Histidine et le Tryptophane. Cependant, en plus de ces acides aminés, nous avons observé d'autres taches d'amino-acides ne figurant pas dans nos solutions témoins. On remarque surtout, tout près du Glycocolle, une tache bleuâtre à forte fluorescence dans l'ultra-violet.

De plus, cet essai nous a permis de constater qu'il est nécessaire de travailler avec des concentrations plus fortes de Biostimulines, puisque les taches du complexe ninhydrine-acides aminés étaient très faibles et fugaces.

Pour remédier à ces inconvénients, nous avons refait une nouvelle expérience en employant une séparation électrophorétique préalable. L'électrophorégramme est séché et on l'utilise ensuite pour effectuer une chromatographie ascendante sur papier. Les Biostimulines liquides concentrées sont déposées à 2 cm du bord du papier en une strie de 2 cm de long, puis l'électrophorèse est pratiquée en tampon de pH = 3,9, pendant environ 3 heures à 200 volts. Après ce temps, la bande est retirée, séchée, roulée en cylindre d'après la technique de CRAMER (27). Ce cylindre est suspendu dans une cloche à chromatographie où l'atmosphère est préalablement saturée par les vapeurs du solvant servant à la migration. On l'y maintient pendant 18 heures, temps strictement indispensable, comme l'ont prouvé des essais préliminaires. Après ce temps de saturation, le cylindre est descendu dans le solvant sur une hauteur de 0,5 cm, au moyen d'un fil sortant en haut de la cloche par un petit orifice que l'on bouche ensuite hermétiquement.

Parallèlement, nous avons suspendu dans la même cloche un cylindre de papier filtre qui avait reçu les solutions témoins d'acides aminés. Comme solvant, nous avons employé :

Butanol	40 g
Acide acétique cristallisé	10 g
Eau distillée	10 g

Ce solvant a l'avantage d'être peu sensible aux changements de température, le mélange est très stable, les valeurs de Rf pour les amino-acides sont élevées et les taches, assez distantes les unes des autres, sont bien délimitées.

De plus, nous avons effectué deux expériences sensiblement identiques, en employant comme solvant de migration :

1° Une solution aqueuse saturée de collidine ;

2° Le mélange pyridine+acide acétique+eau, antérieurement décrit. Ces deux solvants ont donné des résultats décevants.

L'expérience au moyen du solvant butanol + acide acétique + eau a duré 7 heures et le solvant a migré sur une hauteur de 23 cm. Comme révélateur nous avons eu recours à la solution de ninhydrine et on stabilisait ensuite avec la solution de nitrate de cuivre. En même temps, nous avons pratiqué deux chromatogrammes témoins avec deux cylindres contenant :

1° Phényl-alanine, Acide aminobutyrique, Acide aspartique, Acide glutamique, Proline, Tryptophane, Ornithine, Glycocolle, β -alanine et Histidine ;

2° Acide aspartique, Acide glutamique, Glycocolle, β -alanine, Acide β -aminobutyrique et Histidine.

A la suite de ces essais nous pouvons confirmer l'existence, dans notre Biostimuline, des acides aminés déjà décelés antérieurement : Glycocolle, Acide aspartique, Acide glutamique, et la détermination définitive du Tryptophane, de la Proline et probablement de la Leucine.

Quant à l'Histidine, dont nous soupçonnions la présence dans nos précédents essais, elle ne peut pas être indubitablement caractérisée par le révélateur à la ninhydrine ; on sait en effet que le révélateur spécifique de cet acide aminé ainsi que de la Tyrosine est l'acide sulfanilique diazoté.

Les acides aminés ainsi caractérisés présentent dans le solvant au butanol les valeurs Rf suivantes :

TABLEAU N° 10

Caractérisation des acides aminés par chromatographie monodimensionnelle

Acide aminé	Valeur de Rf
Glycocolle	26
Acide aspartique	24
Acide glutamique	30
Tryptophane	50
Proline	43
Leucine	73
Histidine	20

Une nouvelle expérience a été pratiquée en chromatographie descendante, selon la technique de CRAMER, ce qui nous a permis l'emploi de feuilles de papier filtre plus grandes. Cette méthode devait amener une séparation plus nette des différents acides aminés. Les feuilles de papier filtre sont disposées pendant 24 heures dans la petite quantité de solvant qui se trouve au fond de la cuve. On introduit ensuite le solvant dans la gouttière prévue à cet effet dans le haut de l'appareil et on procède à la chromatographie pendant 8 heures. Le solvant utilisé était de nouveau le mélange *butanol + acide acétique + eau distillée*. La chambre chromatographique contenait une feuille pour la *Biostimuline* et deux feuilles chargées du *mélange témoin des différents acides aminés*, comme précédemment.

Cette expérience a confirmé nos résultats antérieurs, principalement en ce qui concerne la présence de *Leucine*.

Pour terminer cette série d'expériences, nous avons effectué une électrophorèse suivie de chromatographie avec une concentration de la *Biostimuline liquide plus forte*. A cet effet, nous avons déposé sur toute la largeur de nos bandes de papier filtre, et à plusieurs reprises, la solution concentrée de *Biostimuline*. Les feuilles ainsi chargées ont été traitées comme précédemment. Ces essais nous ont permis de déceler définitivement, *en plus des acides aminés déjà caractérisés, la présence de l'Arginine (Rf = 20) et de la β -alanine (Rf = 37)*.

Comme on le constate, les Rf de *l'Arginine et de l'Histidine* sont identiques dans ces conditions expérimentales. C'est pour cela que nous avons ensuite eu recours *au révélateur à l'acide suljanilique diazoté* préparé d'après la technique de CRAMER. Dans ces conditions, nous avons pu mettre en évidence la présence de *l'Histidine dans nos Biostimulines*, avec un Rf analogue au chromatogramme témoin (Rf = 6).

En définitive, nous avons donc pu mettre en évidence la présence de neuf acides aminés dans nos Biostimulines liquides.

Pour pousser encore plus loin nos investigations dans ce domaine, nous avons effectué une nouvelle expérience par électrophorèse sur papier à 265 volts durant 2 heures 15. L'électrophorégramme était ensuite soumis à la chromatographie ascendante, en présence d'un témoin. Cette technique nous a permis de mettre en évidence *un dixième acide aminé : la Valine*.

Afin de vérifier l'exactitude des résultats obtenus, nous avons pratiqué une chromatographie bidimensionnelle en couche mince au moyen de notre solution de *Biostimuline concentrée* et comme solution témoin *un mélange des dix amino-acides trouvés* :

	Rf
Leucine	73
Tryptophane	50
Proline	43
Histidine	20
Glycocolle	26

β -Alanine	37
Arginine	20
Valine	60
Acide glutamique	30
Acide aspartique	24

Dans la première phase nous avons employé comme solvant migrateur un mélange de :

Butanol	40 g
Acide acétique cristallisé	10 g
Eau distillée	10 g

et pour la seconde phase :

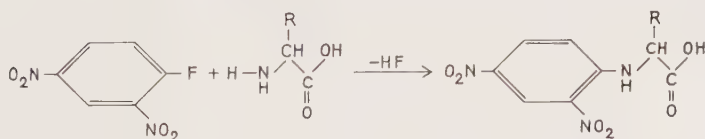
Phénol	75 g
Eau distillée	25 g

Les taches étaient concordantes avec celles obtenues sur le chromatogramme témoin, et ceci au point de vue valeurs de R_f et de la teinte des taches révélées.

Une deuxième chromatographie en couche mince a été effectuée avec les dérivés dinitrophényles des acides aminés. Cette méthode donne des combinaisons beaucoup plus stables et d'identification plus aisée.

Préparation

On mélange dans un tube à essai en verre fusible 1 ml de Biostimuline concentrée et 1 ml de solution aqueuse saturée de carbonate de soude. On prépare d'autre part une solution à 10 % de dinitrofluorobenzol dans l'acétone. On mélange les deux solutions, on bouche le tube avec un bouchon de caoutchouc et on le dispose pendant 72 heures dans un dispositif à agitation rotative. Le schéma ci-dessous illustre la réaction chimique, transformant l'acide aminé en dinitrophényle de l'acide aminé (DNP) :



On épuise ensuite l'excès de 2,4,dinitrofluorobenzol avec de l'éther. La phase aqueuse est acidifiée au moyen de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et épuisée encore trois fois par chaque fois 5 ml d'éther.

Le DNP-Arginine et le DNP-Histidine se trouvent dans la phase aqueuse, tandis que les autres acides aminés passent dans l'extract éthéré acide. Celui-ci est évaporé à l'abri de la lumière et le résidu sec est repris dans 1 ml d'eau distillée. On y ajoute l'extract aqueux contenant le DNP-Arginine et le DNP-Histidine. Le mélange aqueux est ensuite soumis à la chroma-

tographie en couche mince pendant 4 heures, en présence du solvant de migration :

Chloroforme	70 ml
Alcool benzylique	30 ml
Acide acétique cristallisé	3 ml

Ce chromatogramme a révélé onze taches jaunes, fluorescentes dans l'ultra-violet. Nous exprimons ci-dessous les valeurs de Rf trouvées :

<i>DNP</i>	<i>Rf</i>
Leucine	82
Tryptophane	69
Proline	65
Histidine	11
Glycocolle	32
β -Alanine	71
Arginine	68
Valine	79
Acide glutamique	26
Acide aspartique	13

La onzième tache se situant à $Rf = 95$ correspond à la 2,4,dinitraniline qui est un dérivé de synthèse.

Nous avons ensuite pratiqué un chromatogramme bidimensionnel en ayant recours dans la première phase au solvant :

Chloroforme	70 ml
Alcool amylique	30 ml
Acide acétique cristallisé	3 ml

et dans la seconde phase :

Chloroforme	95 ml
Méthanol	5 ml
Acide acétique cristallisé	1 ml

Ce chromatogramme nous a permis de relever les valeurs de Rf suivantes :

TABLEAU N° 11

Caractérisation des acides aminés par chromatographie bidimensionnelle

DNP-amino acide	Valeurs de Rf	
	1 ^{re} dimension	2 ^e dimension
Leucine	80	100
Tryptophane	69	54
Proline	67	78
Histidine	8	12
Glycocolle	40	31
β -Alanine	73	99
Arginine	66	48
Valine	76	96
Acide glutamique	31	12
Acide aspartique	9	7

La chromatographie mono- et bidimensionnelle nous a donc permis de situer et de caractériser indubitablement *les dix acides aminés* contenus dans notre concentré de Biostimulines.

CHAPITRE V

RECHERCHE DES DÉRIVÉS PROTIDIQUES, PEPTIDIQUES, GLUCIDIQUES ET INDOLIQUES DES BIOSTIMULINES

Nous avons tenté de déceler dans notre concentrat de *Biostimuline liquide d'éventuels dérivés protidiques et peptidiques*, ce qui de prime abord paraissait invraisemblable, puisqu'à la suite de la stérilisation et de la concentration, ces produits devaient avoir subi une dénaturation.

Le concentrat a donc été soumis à une hydrolyse acide ; à cet effet, nous avons mélangé une partie de concentrat à cinq parties d'acide chlorhydrique à 10 % dans un tube de verre qui a ensuite été scellé à la flamme et placé pendant 18 heures à 100 °C. Le mélange réactionnel était ensuite déshydraté dans le vide sur de la soude en pastilles, ce qui amène en même temps la neutralisation du liquide réactionnel. Le résidu sec était repris dans un peu d'eau distillée et employé pour la chromatographie en couche mince. Celle-ci a montré l'absence de tout autre acide aminé qui aurait pu apparaître à la suite de l'hydrolyse, de même que la disparition du *Tryptophane*, ce qui prouve la dénaturation de toute substance protidique ou peptidique dans nos *Biostimulines*, exposées au cours de leur préparation à des températures très élevées.

Nous avons de plus préparé des *DNP-dérivés* à partir de la solution hydrolysée, que nous avons soumis également à la chromatographie en couche mince. Ici aussi, nous n'avons pu déceler aucun dérivé nouveau.

Recherche des dérivés glucidiques

Etant donné l'origine végétale de notre *Biostimuline*, nous avons pensé qu'elle pourrait renfermer de l'*amidon* et d'autres *polysaccharides*. Pour identifier l'*amidon*, nous avons procédé à la réaction suivante :

On introduit une goutte de solution de Lugol dans la solution de *Biostimuline* ; on constate l'apparition d'une coloration rouge-violette qui disparaît par chauffage et qui réapparaît après refroidissement. Cette réaction est caractéristique de l'*amylopectine*. Il est très probable que l'*amylose* est détruite au cours de la macération des germes de céréales dans l'eau. On sait que l'amidon est constitué de 20 % d'*amylopectine* et d'environ

80 % d'amylose. L'*amylopectine* est un principe pectiniforme qui ne se colore pas en bleu franc par l'iode, mais en bleu violacé. C'est elle qui donne à l'empois d'amidon sa consistance de gelée. L'*amylopectine* gonfle dans l'eau sans s'y dissoudre, en donnant des sels colloïdaux.

Pour contrôler si nos solutions de *Biostimuline* renferment, en dehors de l'amidon, d'autres glucides, nous avons procédé à une chromatographie en couche mince. En plus des *Biostimulines* en expérience, nous avons déposé sur la plaque un certain nombre de sucres connus. Comme solvant de migration nous avons eu recours à un mélange de :

Acétate d'éthyle	65 ml
Isopropanol	20 ml
Eau distillée	15 ml

La durée de migration était de 45 minutes et le chromatogramme était révélé par le mélange :

Acide orthophosphorique	1,0 g
Solution alcoolique à 0,2 % de phloroglucine.	10,0 g

Le révélateur était vaporisé sur la plaque de gel. On laissait sécher pendant 5 à 10 minutes entre 100 et 105 °C. Sur ce chromatogramme on a décelé trois taches présentant des valeurs de Rf de 10, 16 et 45. Le mélange des sucres a donné, avec le solvant de migration employé, des taches de différentes couleurs et des valeurs de Rf caractéristiques. La tache dont le Rf = 10 correspondait au *saccharose* présentait dans les deux cas une teinte verdâtre. La tache dont le Rf = 16 correspondait à celle formée par le *glucose* à Rf = 15. Ces taches sont toutes deux colorées en bleu. La troisième tache à Rf = 45 se rapproche beaucoup de celle obtenue avec le *lévulose*, mais la teinte grisâtre est peu caractéristique.

Pour contrôler ces faits et pour obtenir des taches plus importantes et des valeurs de Rf plus différenciées, nous avons pratiqué un *second chromatogramme* avec le solvant suivant :

Butanol	45 ml
Pyridine	25 ml
Eau distillée	40 ml

Nous avons mis en expérience la *Biostimuline liquide* telle quelle, la solution de *Biostimuline hydrolysée* et la solution témoin des différents sucres. La durée de migration a été de 6 heures pour atteindre un front de solvant de 10 cm. Le révélateur était le réactif phloroglucine + acide orthophosphorique.

Dans ces conditions, nous avons noté des valeurs de Rf assez élevées. La *Biostimuline hydrolysée* donne trois taches situées différemment par rapport à celles produites par la *Biostimuline naturelle*. Cette dernière donne des taches correspondant au *saccharose* (Rf = 35, coloration verte), au *glucose* (Rf = 90, coloration bleue) de la solution témoin. L'hydrolysat de *Biostimuline* donne des taches correspondant au *lévulose* (Rf = 60, teinte violette), au *glucose* déjà mentionné et au *ribose* (Rf = 52, teinte jaune-vert).

En résumé, on peut conclure de ces expériences que la *Biostimuline liquide* contient les sucres suivants : *amylopectine*, *saccharose* (qui se décompose en glucose et lévulose après l'hydrolyse) et *ribose* ; ce dernier n'apparaît qu'après hydrolyse et provient probablement d'un nucléotide.

Recherche des dérivés indoliques

Sur les conseils du professeur MARCHAL, nous avons recherché dans nos *Biostimulines des dérivés indoliques*, et principalement l'acide indol- β -acétique et des produits homologues qui, comme on le sait, sont des dérivés du *Tryptophane* et des facteurs de croissance rencontrés dans les végétaux. Ce corps a déjà été isolé à partir d'extraits de maïs et d'autres céréales par Van OVERBECK et PILET (28), (29).

Nous avons pratiqué une chromatographie en couche mince pour déceler la présence éventuelle de ces facteurs de croissance dans la *Biostimuline liquide* concentrée et par rapport à des solutions témoins :

Solution alcoolique de l'acide indol- β -acétique ;
Solution alcoolique de l'acide β -indol-propionique ;
Solution aqueuse de Tryptophane ;
Solution aqueuse de l'amide nicotinique.

Comme solvant migrateur, nous avons eu recours au mélange :

Isopropanol 8 ml
Ammoniaque concentrée 1 ml
Eau distillée 1 ml

Comme révélateur, nous avons employé le réactif de Van URK :

p-diméthylaminobenzaldéhyde 1 g
acide chlorhydrique à 25 % 50 ml
alcool éthylique à 96 % 50 ml

On mélange d'abord les deux derniers réactifs, puis on dissout le dérivé aldéhydrique dans cette solution.

On vaporise ce réactif sur la plaque jusqu'à obtention d'une couche uniforme transparente. Si l'on travaille en milieu alcalin, on évapore d'abord une partie de l'ammoniaque par chauffage à 50 °C pendant 5 minutes. Si on a opéré en milieu acide, on pratique la vaporisation seulement 2 à 5 minutes après la fin de la chromatographie. Dans les deux cas, on expose les plaques pendant 20 minutes à 50 °C. D'autre part, on prépare de l'Eau Régale en mélangeant :

Acide chlorhydrique concentré 3 vol.
Acide nitrique concentré 1 vol.

On fait passer les vapeurs de ce réactif à la surface des plaques.

Le premier essai, pratiqué avec de la *Biostimuline liquide*, concentrée deux semaines plus tôt, s'est montré totalement négatif.

Un deuxième chromatogramme, effectué au moyen de *Biostimuline concentrée* extemporanément, a révélé une tache d'une belle teinte violette, dont le $R_f = 56$; celle-ci correspondait exactement à celle produite par l'*acide indol- β -acétique témoin*. Nous avons retrouvé sur ces chromatogrammes le *Tryptophane*, dont la tache a un $R_f = 40$ et présente une teinte bleu verdâtre. Cette technique n'a pas permis de mettre en évidence d'autres substances indoliques.

Un nouvel essai a été tenté, dans les mêmes conditions expérimentales, mais en employant comme solvant de migration :

Chloroforme	95 ml
Acide acétique cristallisé	5 ml

Après révélation, ce chromatogramme montrait de nouveau une tache bleu violet, dont le $R_f = 30$ correspondait au témoin *acide indol- β -acétique* et une tache correspondant au *Tryptophane* qui n'a pas migré.

Comme nous avons pu le démontrer, les dérivés indoliques peuvent être mis en évidence dans les solutions fraîchement préparées et concentrées, puisque dans ces deux conditions ils sont visibles après l'action des réactifs acides ou alcalins forts ou même dilués. Jusqu'à ces derniers temps, on croyait que l'*acide indol- β -acétique* était totalement insoluble dans l'eau, ce qui a été réfuté par les essais récents de PILET qui a pu prouver sa solubilité partielle. Il n'est donc pas étonnant que nous ayons pu le mettre en évidence dans nos extraits aqueux de germes de céréale.

Un autre essai de caractérisation de l'*acide indol- β -acétique* a été réalisé au moyen de l'électrophorèse. Nos extraits de *Biostimulines* ont été soumis à un courant de 220 volts pendant 3 heures. L'électrophorégramme a été révélé par le réactif de Van URK et nous a permis de constater que ce dérivé indolique migrerait vers l'anode.

Recherche d'autres facteurs biogènes

Nous avons essayé de mettre en évidence l'*acide gibberellique* mentionné par KUROSAWA (30) et par YABLITA et HAYASHI (31), puis étudié par STODOLA (32) en 1958 pour la première fois. Les travaux de PILET et Van OVERBEEK consacrés à l'action des gibberellines sur l'activité auxine-oxydasique ont attiré l'attention des biologistes français sur ces facteurs de croissance végétaux, à partir de 1957. On trouvera toutes les données sur l'étude des gibberellines dans l'excellente monographie de BRIAN, GROWE et Mac MILLAN (33).

Monsieur NETIEN, *Professeur de Botanique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*, a eu l'amabilité de procurer à Monsieur le Professeur MARCHAL une petite quantité de cette substance, ce dont nous le remercions bien vivement ici.

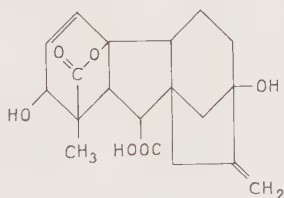
Au cours de nos essais précédents ayant pour but la mise en évidence des amino-acides, des glucides, etc., nous avons toujours constaté la présence d'une tache fluorescente dans l'ultra-violet, localisée au point de dépôt des solutions de Biostimuline. STAHL mentionne que les *gibberellines* ne migrent pas dans les chromatogrammes en couche mince avec les solvants usuels. Il faut pratiquer un chromatogramme continu de 18 heures au moins pour obtenir une tache à un Rf appréciable.

Nous avons donc tenté un essai en employant des plaques de *gel de silice G inactivé Merck*. Ces plaques étaient chargées au moyen de la solution concentrée de Biostimuline et soumises à l'action du solvant chromatographique suivant :

Benzol	70 g
Butanol	25 g
Acide acétique cristallisé	5 g

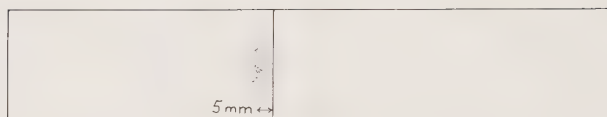
La migration jusqu'à 10 cm de hauteur demande environ 1 heure. Le réactif spécifique et très sensible pour les gibberellines est constitué par une *solution alcoolique d'acide sulfurique concentrée à 5 %*. On vaporise ce réactif et on laisse sécher à l'air pendant 15 minutes, puis on chauffe la plaque pendant 10 minutes à 110 °C avant d'en effectuer la lecture sous l'action des rayons UV, et on note l'apparition d'une tache fluorescente d'un vert bleuâtre, dont le Rf = 65.

La solution témoin de gibberelline pure nous a montré indubitablement que nos *Biostimulines* contiennent la *gibberelline A3* ou *acide gibberellique*, dont nous donnons ci-dessous la formule de constitution :



Un deuxième chromatogramme a été révélé d'un côté par la *ninhydrine* et de l'autre par le *réactif phloroglucine + acide phosphorique*. Ce chromatogramme nous a permis de constater que les acides aminés et les sucres ne migrent pas dans le solvant benzol + butanol + acide acétique, qui entraîne uniquement les *gibberellines*.

Nous avons pratiqué d'autre part une électrophorèse sur papier en employant un courant de 220 volts et une durée de migration de 3 heures en opérant avec un tampon dont le pH = 3,9. A la lecture aux rayons UV on constatait alors que les *acides gibberelliques* migraient vers la cathode, mais à une distance ne dépassant guère 5 mm, comme nous le montrons dans le schéma ci-dessous, et se caractérisaient par une tache fluorescente jaune verdâtre.



Nous avons essayé de fixer cet électrophorégramme en employant comme révélateur le mélange acide sulfurique + alcool et en chauffant ensuite pour sécher. Malheureusement, ces réactions sont trop brutales et le papier filtre se désagrège à la moindre manipulation.

CHAPITRE VI

ESSAIS BIOLOGIQUES DE CARACTÉRISATION DU FACTEUR BIOGÈNE ACTIF

Après avoir fait l'analyse physico-chimique de nos extraits de Biostimulines, nous avons jugé nécessaire d'identifier le principal composant biogène actif. On connaissait jusqu'à présent l'activité biogène de l'*acide indol-3-acétique* et de l'*acide gibberellique* sur les plantes supérieures, soit en stimulant la croissance, soit en la freinant. On ignorait cependant leur rôle vis-à-vis des bactéries ; nous avons donc essayé de résoudre ce problème.

Dans ce but, nous avons tenté de fractionner nos Biostimulines, de séparer ces fractions pour les examiner quant à leur activité biologique.

Nous avons tout d'abord effectué une *double électrophorèse sur papier*. L'électrophorégramme de 19 cm de long est divisé en 19 petites bandes de 1 cm de large et de 2 cm de long, qui sont découpées et disposées dans une boîte de Pétri pour être stérilisées pendant 2 heures à 100 °C. D'autre part, nous avons préparé deux fois 19 tubes de culture munis du tube de Besson pour la méthode gazométrique. Dans chacun de ces tubes nous avons introduit une des parcelles découpées de l'électrophorégramme, puis 10 ml de milieu au pantothénate. Le tout était stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 105 °C. Après refroidissement, les 38 tubes furentensemencés au moyen de 10 gouttes d'une culture de *Zymomonas* (*deuxième subculture*) en milieu au pantothénate. Nous donnons dans le tableau n° 12 le résultat de cette expérience.

Interprétation

A la lecture de notre protocole expérimental on s'aperçoit que ce sont les tubes n°s 7, 8 et 9 qui présentent l'activité de croissance la plus marquée. Le tube n° 8 contient la parcelle de l'électrophorégramme où la Biostimuline a été déposée. Quinze heures après l'ensemencement, on note déjà un début de dégagement gazeux dans ces trois tubes. On peut en conclure que *les facteurs de croissance de la Biostimuline* restent concentrés au voisinage du point de départ de la migration électrophorétique. Les autres parcelles introduites dans les tubes de culture n'occasionnent le début de la crois-

TABLEAU N° 12

Mesure du pouvoir gazogène des *Biostimulines* fractionnées après électrophorèse

Tube n°	Lecture après					
	0 heure	15 heures	18 heures	21 heures	24 heures	39 heures
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—
7	—	0,05	0,3	0,9	1,5	1,5
8	—	0,05	0,6	1,2	1,5	—
9	—	0,05	0,3	0,6	1,2	—
10	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—
20 témoin	—	—	—	—	—	—

sance bactérienne qu'au bout de trois jours. Quant au tube témoin n° 20, le développement ne s'y manifeste que vers le cinquième jour. Cette expérience, effectuée en double, a donné des résultats sensiblement identiques dans les deux cas.

Nous avons ensuite effectué une expérience en ayant recours à la méthode des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé USA. Les parcelles sont disposées sur ce milieu après qu'il ait étéensemencé avec une suspension de *Zymomonas* (deuxième subculture) en milieu de pantothénate. Cette méthode est employée couramment pour les antibiogrammes et ILLIEN l'avait déjà utilisée pour contrôler l'activité des *Biostimulines* placentaires. Elle ne nous a pas donné des résultats satisfaisants, les facteurs actifs diffusant dans la surface gélosée plus rapidement que ne se manifeste la croissance, de sorte que la culture se développe d'une façon uniforme à partir du cinquième jour.

Nos expériences chimiques antérieures nous avaient permis de localiser l'acide indol- β -acétique et l'acide gibberellique dans les parcelles n°s 7 et 9, alors que dans la parcelle n° 8, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence un corps chimique défini. L'optimum de croissance s'est manifesté dans le tube n° 8, suivi du tube n° 7 (acide indol- β -acétique) et du n° 9 (acide gibberellique). Il faut cependant tenir compte de la présence éventuelle d'acides aminés et de glucides. Pour éliminer ces substances, nous avons effectué une chromatographie en couche mince avec le solvant migra-

teur benzol + butanol + acide acétique, sachant que ce solvant permet de séparer les acides aminés et les sucres des acides indol- β -acétique et gibberellique.

La migration s'est effectuée sur une hauteur de 10 cm, puis le gel a été partagé en 5 bandes horizontales de 2 cm de largeur. Pour exprimer nos résultats, nous avons numéroté ces bandes de 1 à 5 en commençant par la plus haute. La bande la plus basse (n° 5) avait une largeur de 2,5 cm, ceci pour récupérer la totalité des taches de migration ayant pu éventuellement diffuser au-dessous de la ligne de départ du chromatogramme. La plaque chromatographique était déshydratée, puis le gel des 5 zones était récupéré en le râclant.

En même temps, nous avons effectué une expérience parallèle pour caractériser les substances biogènes au moyen du révélateur phloroglucine + acide phosphorique, de la ninhydrine, du réactif de Van URK et de la solution à 5 % d'acide sulfurique.

Nous avons ainsi pu localiser dans la zone n° 1 l'acide indol- β -acétique ; dans la zone n° 2 l'acide gibberellique et finalement dans la zone n° 5 les amino-acides et les glucides ne migrant pas dans le solvant employé. A partir d'un premier chromatogramme, nous avons alors récolté les 5 zones séparément dans des tubes de culture ; elles furent déshydratées pendant 2 heures à 100 °C. On introduit alors dans ces tubes de culture le tube de Besson et 10 ml de milieu au pantothénate ; le tout est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à 105 °C. Après refroidissement, on ensemence au moyen d'une suspension de *Zymomonas* (deuxième subculture) en milieu au pantothénate. Dans le tableau suivant, nous exprimons les résultats obtenus :

TABLEAU n° 13

Mesure de l'activité gazogène de certains composants des Biostimulines

Tube n°	Lecture après X heures							
	0	3	6	9	24	27	30	33
1	—	—	—	—	0,05	1,0	1,5	1,5
2	—	—	—	—	0,05	0,3	0,9	
3	—	—	—	—	0,6	1,2	1,5	
4	—	—	—	—	—	—	—	
5	—	—	—	—	—	—	—	

Interprétation

La croissance optimale se trouve dans la zone n° 3, dans laquelle nous n'avons pas pu identifier un corps chimiquement connu. Vient ensuite la zone n° 1, suivie de la zone n° 2. Dans la zone n° 5, qui correspond aux acides aminés et aux glucides, on ne note aucune accélération de la croissance. Par la suite, nous avons refait une nouvelle expérience.

Nouvelle expérience au moyen d'une technique modifiée

Nous avons effectué une expérience de contrôle au moyen d'une autre plaque de chromatographie en couche mince. Les cinq bandes sont marquées, puis grattées avec une petite spatule en disposant la plaque en position presque verticale. Les produits de grattage sont récupérés séparément sur des feuilles de plexiglass. On commence par la bande inférieure n° 5, ayant une largeur de 2,5 cm, puis en remontant on recueille successivement les bandes n°s 4, 3, 2 et 1, ayant chacune une largeur de 2 cm. On introduit les matières pulvérisées dans cinq tubes numérotés pour stériliser à l'autoclave à 105 °C pendant 20 minutes. En même temps, on stérilise une boîte de Pétri et on prépare le milieu USA gélosé qu'on liquéfie aussi à l'autoclave. Après refroidissement à 45 °C environ de tout ce matériel, on marque le fond extérieur de la boîte de Pétri vers la périphérie par les n°s 1 à 5, à une distance de 5 cm l'un de l'autre. On introduit aseptiquement le milieu liquéfié, puis la poudre correspondant à chaque bande du chromatogramme selon le numéro prévu sur la boîte de Pétri. On laisse celle-ci au repos en position horizontale. Les poudres se sédimentent à travers le milieu et tombent au fond de la boîte. Le milieu une fois solidifié est ensemencé avec 10 gouttes d'une suspension de *Zymomonas* (deuxième subculture) en traversant la couche gélosée au moyen d'une pipette de Pasteur soigneusement calibrée. La boîte de Pétri est placée à 27 °C. On observe le développement des cultures à partir de la douzième heure de l'ensemencement. Après 22 et 24 heures de culture, nous constatons le début de la croissance de *Zymomonas* au niveau des champs n°s 3, 1 et 2, en ordre décroissant. *Zymomonas mobile* étant une bactérie facultativement anaérobie, le développement s'effectuait en profondeur de la gélose. Les bulles de gaz de CO₂ apparaissaient rapidement. Par contre, le développement de *Zymomonas* ne se manifestait qu'entre la trente-sixième et la quarante-deuxième heure dans les champs n°s 4 et 5.

Nous pouvons donc conclure que dans cette expérience la bande chromatographique n° 3 montrait l'activité biogène optimale ; celle-ci était moindre pour la zone de l'acide indol- β -acétique, suivie de celle renfermant l'acide gibberellique.

Nouvelle expérience exécutée en cupule

Nous avons encore préparé une boîte de Pétri contenant le milieu USA gélosé. Après refroidissement et solidification du milieu, nous y découpons, au moyen d'un perce-bouchon métallique de 1 cm de diamètre et en prenant toutes les précautions d'asepsie, cinq cuvettes ; dans chacune d'elles nous avons placé une des poudres des cinq bandes récupérées du chromatogramme. On ensemence ensuite chaque poudre avec 10 gouttes d'une deuxième subculture, en milieu au pantothénate, de *Zymomonas* âgée de 18 heures. On replace aseptiquement les rondelles découpées dans les cinq trous et on dispose la boîte de Pétri à l'étuve à 27 °C.

La lecture de l'amorcement des cultures nous a encore confirmé les résultats antérieurs, c'est-à-dire : vitesse de croissance décroissante de la

zone 3 vers les zones 1 et 2, puis, beaucoup plus tardivement, dans les zones 4 et 5.

Contrôle de l'activité biogène par le biophotomètre

L'extrait biogène était contrôlé par des chromatogrammes en couche mince. La migration était effectuée sur 10 cm. Le chromatogramme était ensuite déshydraté et divisé en 11 bandes de 1 cm. La bande n° 11 correspondait à la zone située à 1 cm en dessous de la ligne de dépôt de l'extrait biogène. On obtenait ainsi des bandes, dont les numéros correspondaient à ceux des expériences antérieures de la façon suivante :

TABLEAU n° 14

Répartition du nouveau découpage des bandes chromatographiques par rapport à l'expérience précédente

Chromatogramme antérieur divisé en 5 bandes de 2 cm de large	Nouveau chromatogramme divisé en 11 bandes de 1 cm de large	
Bande N°	Bande N°	
	Premier essai	Deuxième essai
1	1a	1b
2	2a	2b
3	3a	3b
4	4a	4b
5	5a	5b
6	6	

(La bande n° 6 est située à 1 cm en-dessous de la ligne de dépôt)

Cette nouvelle expérience a été pratiquée au moyen de trois chromatogrammes en couche mince. Les trois poudres racless de chacune des bandes de 1 cm de large sont réunies. Nous obtenons donc 11 échantillons de poudre de grattage constitués par la même zone des trois chromatogrammes respectifs.

Les onze bandes de gel de silice pulvérisées sont introduites chacune dans un tube de centrifugation, puis on y ajoute 5 ml d'éthanol dilué à 50 % avec de l'eau distillée. On laisse reposer pendant 12 heures en agitant de temps en temps. On centrifuge et on décante les surnageants alcooliques sur des filtres préalablement préparés. Chaque fraction est évaporée dans un appareil rotatif à évaporation sous vide, puis le résidu sec est dissous dans 4 ml d'une solution aqueuse à 10 % d'éthanol. Ces 4 ml sont introduits quantitativement dans les fioles du biophotomètre, puis on complète avec 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration. On agite soigneusement et on ensemence avec 15 gouttes d'une deuxième subculture de *Zymomonas*, âgée de 18 heures. On dispose les six fioles à l'étuve à 27 °C pendant 12 heures, puis on procède à la mesure biophotométrique de chaque échantillon.

Le biophotomètre ne disposant que de six fioles, l'expérience a été conduite en deux temps, selon le mode opératoire exposé dans le tableau n° 14.



Fig. n° 13. — Courbes biophotométriques de l'activité biogène des différentes fractions séparées par chromatographie. Les courbes marquées sur le graphique par 1 - 3 - 5 - 7 - 9 - 11 correspondent aux bandes 1a - 2a - 3a - 4a - 5a - 6 du tableau n° 14.

Interprétation

On note dans les deux biophotogrammes :

Les courbes 3a et 3b (couleur violette) montrent un amorçage et une croissance optimaux, viennent ensuite les courbes 2a et 2b (rouges), mais en accusant toujours un net retard sur les précédentes au bout de 18 heures. Ce fait est encore plus manifeste pour les courbes 1a et 1b (bleues). Le développement des cultures est insignifiant dans le même laps de temps pour les bandes chromatographiques 4a et 4b (noires), 5a et 5b (vertes) et 6 (brune). Ces courbes évoluent presque en lignes droites parallèles.

On peut donc conclure qu'à partir de la zone 4 (soit à 7 cm de distance de la ligne d'arrêt de migration) il y a absence totale de facteur de croissance biogène. Il ressort d'autre part de cette expérience que l'activité biogène se *manifeste également ici dans la zone 3*, contenant le facteur de croissance non identifié jusqu'à présent. La zone 1 contenant l'*acide indol- β -acétique* et la zone 2 renfermant l'*acide gibberellique* ont une action stimulante nettement inférieure.

Dans le chapitre suivant, nous avons effectué des chromatogrammes sur colonne de Florisil (Mg-silicogel) et de nouveaux chromatogrammes en couche mince sur Silicogel Merck pour essayer d'isoler et de caractériser la substance biogène λ localisée dans la zone n° 3 de nos chromatogrammes précédents.

CHAPITRE VII

ESSAI DE CARACTÉRISATION DU FACTEUR BIOGÈNE ACTIF PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Pour isoler les *trois facteurs biogènes* et plus précisément la *substance X*, principal stimulant dans nos extraits de céréales, nous avons jugé nécessaire d'avoir recours à la chromatographie en colonne.

A ce sujet, nous avons employé une colonne de verre de 50 cm de long et de 17 mm de diamètre. Les deux extrémités ouvertes sont ajustées par rodage calibre NS 4. La partie inférieure est fermée au moyen d'un filtre en verre fritté muni d'un dispositif à robinet. La partie supérieure est garnie d'un entonnoir rodé muni également d'un robinet, permettant de régler l'écoulement en goutte-à-goutte. Le filtre à la base de la colonne permet l'écoulement d'un éluat limpide et débarrassé des substances absorbantes. La colonne est remplie de 40 g de Florisil comme adsorbant ; il s'agit d'un silicate de magnésium synthétique fourni par la Maison FLUKA (Saint-Gall, Suisse) calibré à 60/100 mesh. L'indice « *mesh* » sert à définir la taille des grains d'un substrat d'adsorption : 50 mesh correspondent à 0,297 mm et 100 mesh à 0,149 mm. La taille des grains de *Florisil* se situe donc entre ces deux valeurs, 40 g de ce substrat adsorbant donnent une colonne de 240 mm/17 mm.

Mode opératoire

La colonne en verre est d'abord munie du filtre à sa base, puis on introduit le *Florisil* en tassant par tapotement pour éliminer les bulles d'air qui pourraient provoquer un déroulement irrégulier de l'opération. Après remplissage correct, on dispose sur le haut une rondelle de papier filtre, puis on introduit la solution à examiner. Celle-ci est préparée de la façon suivante : 50 ml d'*extrait de Biostimulines* sont concentrés avec les précautions nécessaires, dans l'appareil rotatif sous un vide de 10 mm de Hg et à la température ambiante. Cette manipulation demande environ 4 heures. L'extrait ainsi concentré est trituré avec 5 g de *Florisil* en une pâte homogène et déshydraté à la température ambiante pendant une nuit. Le résidu sec est ensuite trituré pour obtenir une poudre fine et homogène qui est alors disposée sur la rondelle de papier filtre à la partie supérieure de la colonne, et recouverte d'une couche de coton hydrophile de 0,5 cm d'épaisseur environ. De cette façon, le solvant migrateur introduit par l'entonnoir

se répartit d'une façon régulière sur toute la surface de la poudre. Le solvant employé était le suivant :

Benzène	70 g
Butanol	25 g
Acide acétique cristallisable	5 g

Notre expérience a été effectuée avec 150 g de ce mélange, qui est introduit goutte-à-goutte par l'intermédiaire de l'entonnoir à robinet. Le robinet d'écoulement à la partie inférieure de la colonne reste ouvert jusqu'à ce que le front du solvant atteigne le filtre en verre fritté. A ce moment, on ferme les deux robinets et on attend pendant 2 heures pour stabiliser les différentes phases mobiles ou stationnaires, produisant une séparation nette des différentes zones d'adsorption. Ce temps passé, on ouvre à nouveau les deux robinets, ce qui permet l'introduction du solvant au sommet et son écoulement à la base ; celui-ci doit être réglé à 5 ou 6 gouttes par minute.

L'éluat est récolté en 24 fractions de 5 g dans un collecteur automatique constitué d'un tambour tournant muni de petits tubes dans lesquels on laisse goutter directement l'éluat. L'éprouvette destinée à recueillir l'éluat repose sur une petite balance réglable à un point donné. Cette quantité recueillie (dans notre cas 5 g), le fléau de la balance s'abaisse et déclenche en même temps un contact électrique qui déplace automatiquement le tambour jusqu'à la prochaine éprouvette. De cette façon, on récolte des fractions à poids constant et ceci sans nécessité de surveiller l'opération qui demande un certain temps.

Les 24 fractions ainsi récoltées furent examinées au *biophotomètre* pour mettre en évidence la présence éventuelle d'un facteur biogène. Ensuite, on fractionne, avec les précautions nécessaires, la colonne de *Florisil* pour examiner également la localisation éventuelle des produits biogènes absorbés.

Préparation de l'éluat

Etant donné que notre solvant de migration était composé de Benzène + Butanol + Acide acétique, il nous semblait impossible d'introduire les 24 fractions recueillies directement dans les milieux de culture, étant donné les propriétés nocives du solvant ; il nous fallait donc l'éliminer. Les 24 fractions ont été évaporées dans le vide à température ambiante et dans l'appareil rotatif. Les résidus secs étaient repris par l'éthanol pur, qui était à son tour évaporé, ceci pour éliminer toute trace de benzène, de butanol et d'acide acétique. Les nouveaux résidus furent repris dans chaque fois 3 ml d'une solution aqueuse à 10 % d'éthanol, pour dissoudre autant que possible toutes les substances hydrophiles et lipophiles. Comme nous avons pu le démontrer antérieurement, *Zymomonas mobile* n'est pas inhibé par de petites quantités d'éthanol, puisqu'il en produit jusqu'à 40 % lui-même au cours de la fermentation des sucres. La plupart des solutions alcooliques étaient limpides, quelques-unes des 24 fractions se montraient légèrement troubles et opalescentes. Nous avons essayé de les rendre limpides, soit par filtration, soit par centrifugation pendant 15 minutes à 6 000 t/mn, mais sans succès.

Traitement de la colonne

Théoriquement, on pourrait soupçonner la présence de facteurs biogènes adsorbés par le *Florisil* ; nous avons donc jugé nécessaire de l'examiner également par fractions. La colonne de substance ne pouvant être retirée du tube de verre à l'état humide, puisqu'elle est gonflée et plus ou moins gluante, nous l'avons donc placée pendant 18 heures dans l'étuve à environ 50 °C. Après ce temps, le substrat n'était pas complètement déshydraté, mais on pouvait facilement le retirer du tube en verre au moyen d'une spatule en nickel. Nous avons ainsi récupéré six fractions d'environ 5 cm de long, que nous avons numérotées de bas en haut de 1 à 5 ; la fraction n° 6 était formée par la partie supérieure du substrat se trouvant au-dessus du papier-filtre, c'est-à-dire la zone qui renfermait le mélange biogène à examiner. Ces six fractions étaient séchées séparément, puis on les épuisait par chaque fois 3 ml d'éthanol à 10 %, par un contact de 12 heures, en agitant de temps en temps. Finalement, on centrifugeait et on décantait la fraction liquide sur un filtre pour obtenir un liquide limpide prêt à l'examen biophotométrique.

Analyse biophotométrique

Nous avons introduit dans les 6 fioles du *biophotomètre* 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration, 2 ml d'eau distillée stérile et 2 ml de chaque fraction à examiner. L'ensemble de l'expérience comportait donc 30 fractions en tout, que nous avons numérotées de 1 à 24 pour les éluats et de 25 à 30 pour les extraits provenant de la colonne de *Florisil*. Chaque fiole étaitensemencée au moyen de 10 gouttes d'une deuxième subculture sur milieu au pantothénate de *Zymomonas mobile*. Les deux séries n° 7 à 12 et n° 19 à 24 ont été disposées pendant 12 heures à l'étuve à 27 °C, tandis que les autres séries étaient introduites dans le biophotomètre tout de suite après l'ensemencement.

Le reste des liquides d'extraction (30 × 1 ml) nous a servi à pratiquer des chromatogrammes en couche mince sur *Silicogel Merck*.

Interprétation

Les cinq mesures biophotométriques, comportant chaque fois 6 fioles, nous ont permis de faire les constatations suivantes, en exprimant la croissance par les signes conventionnels suivants : 0 pour l'absence de développement et jusqu'à ++++ pour l'optimum de croissance :

Fioles n ^{os} 1 à 3	0
Fioles n ^{os} 4 et 5	+
Fiole n° 6	0
Fiole n° 7	++
Fioles n ^{os} 8 et 9	+++
Fioles n ^{os} 10 et 11	++
Fioles n ^{os} 12 et 13	+

Fioles n ^{os} 14 à 17	0
Fiole n ^o 18	+
Fiole n ^o 19	+++
Fiole n ^o 20	++++
Fiole n ^o 21	+++
Fiole n ^o 22	++
Fioles n ^{os} 23 à 30	0

Comme on le voit, la croissance se manifestait en deux courbes caractérisées par un pic optimal dans les fioles 8 et 9 d'une part, et 19 à 21 d'autre part. Un développement peu important a été noté encore dans les fioles 4 et 5. En tout état de cause, l'optimum de croissance se situait dans les fioles 18 à 22.

Pour examiner la constitution chimique des différentes fractions, nous avons eu recours à la *chromatographie en couche mince*.

Recherche des sucres par chromatographie en couche mince

Nous avons déposé sur une seule plaque chaque fois 10 µl (*micropipette* CAMAG) des 30 fractions, que nous laissons sécher, puis la présence éventuelle de sucres était révélée au moyen du réactif :

Solution alcoolique de phloroglucine à 0,2 % .. 10 g

Acide orthophosphorique concentré (66,3 %) .. 1 g

La plaque était portée pendant 10 minutes à l'étuve à 105 °C ; on notait alors l'apparition d'une tache d'un vert brunâtre à l'endroit du dépôt de la fraction n^o 30, alors que tous les autres échantillons en expérience ne donnaient aucune tache colorée, ce qui prouve l'existence de sucres dans l'échantillon n^o 30. Comme la fraction n^o 30 correspondait à la partie supérieure du substrat au-dessus du papier filtre, c'est-à-dire à la zone constituée par le mélange biogène à examiner, on peut en conclure que les sucres n'ont pas migré dans le solvant employé.

Recherche des acides aminés

Comme dans l'expérience précédente, nous avons déposé sur une même plaque les 30 fractions différentes à raison de 10 µl. Après séchage, on pulvérise le révélateur (solution de *ninhydrine* dans le *butanol-acide acétique*). La plaque était placée pendant 10 minutes à l'étuve à 105 °C, puis examinée. Nous avons ainsi constaté que seule la fraction n^o 30 présentait une tache rouge-violet. Tous les autres dépôts restaient incolores, d'où l'on peut conclure que les amino-acides ne migrent pas non plus dans le solvant benzène + butanol + acide acétique. En effet, d'après la constitution chimique des sucres et des acides aminés, on voit que ces substances migrent seulement dans des solvants polaires, alors qu'elles ne sont pas entraînées par les solvants apolaires, tels que le benzène par exemple.

Recherche des biostimulines

Pour mettre en évidence les facteurs biogènes éventuellement présents dans les 30 fractions, nous avons encore eu recours à la chromatographie en couche mince de *Silicogel*. A ce sujet, nous avons dû employer trois

plaques chromatographiques qui ont été chargées comme précédemment de 10 µl de chaque fraction en étude. Une plaque était révélée par le réactif de Van URK pour mettre en évidence *les dérivés indoliques*, la seconde traitée au moyen d'une solution alcoolique à 5 % d'acide sulfurique (*acide gibberellique*) et la dernière au moyen du *réactif universel* $\text{KMnO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (autres substances non décelables par les réactifs antérieurement employés).

Il faut remarquer que ce dernier réactif révèle dans la tache n° 30 la présence de *sucres et d'amino-acides*, mais comme nous l'avions constaté par *nos expériences biophotométriques*, cette fraction n° 30 est dépourvue de facteur biogène.

Interprétation

Nous résumons dans le tableau suivant les résultats obtenus au cours de ces expériences.

TABLEAU N° 15

Mise en évidence de différents facteurs biogènes avec les réactifs suivants :

FiOLE n°	Réactif Van URK (dérivés indoliques)	Réactif alcool + H_2SO_4 (acide gibberellique)	Réactif universel (autres facteurs biogènes)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	+	0	+
5	+	0	+
6	0	0	0
7	+	0	+
8	+++	+	+
9	++	+++	+
10	+	+++	+
11	0	++	+
12	0	+	+
13	0	+	+
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	+
19	0	0	+
20	0	0	+
21	0	0	+
22	0	0	+
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	++

Il semble ressortir de ces essais qu'en plus de l'acide β -indolique et de l'acide gibberellique, notre produit contient encore une troisième substance ou un mélange de substances. Afin d'identifier ce produit, nous avons entrepris l'expérience suivante :

Nous avons pratiqué une chromatographie en couche mince à l'aide des fractions n^{os} 18 à 22, avec comme solvant de migration le réactif benzène + butanol + acide acétique. Le chromatogramme était révélé par le réactif universel (permanganate de potasse 0,5 g - Acide sulfurique concentré 15 ml) et montrait que les cinq taches avaient migré ensemble au même niveau, avec un $R_f \times 100$ de 58 ; il s'agissait donc d'un même produit, dont l'essai d'identification fera l'objet d'une expérience ultérieure.

Nous avons entrepris un autre chromatogramme en colonne en utilisant le même tube de verre et la même quantité (40 g) de Florisil. Les conditions expérimentales étaient les mêmes, sauf en ce qui concerne le solvant, qui n'était plus constitué par le benzène + butanol + acide acétique, mais par le réactif suivant :

Isopropanol à 17 %	90 g
Ammoniaque	5 g
Eau distillée	75 g

dont nous avons utilisé 120 ml.

Nous avons récupéré 12 fractions de 5 g d'éluat à l'aide du collecteur automatique, alors que le reste du solvant est retenu dans la colonne d'adsorbant. La colonne a été de nouveau séchée comme dans l'expérience précédente, puis partagée en 6 fractions numérotées de 1 à 6 en commençant par le bas et en terminant par celle se trouvant au-dessus du papier filtre et qui contenait le produit à examiner. Nous avons donc au total 18 fractions numérotées de 1 à 12 pour les éluats et de 13 à 18 pour les extraits provenant de la colonne de Florisil.

Les éluats sont évaporés à siccité dans le vide, puis repris dans 5 ml d'alcool à 10 %, tandis que les extraits solides sont repris dans 5 ml d'éthanol à 50 %, laissés au repos pendant 15 minutes, puis extraits au bain-marie bouillant. Ces six fractions étaient ensuite concentrées presque à siccité sous vide dans l'appareil rotatif, et repris dans 5 ml d'alcool à 10 %. On introduisait ensuite dans les fioles du biophotomètre successivement 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration, 2 ml de solution à examiner et 2 ml d'eau distillée stérile. On ensemait par 10 gouttes d'une deuxième subculture de *Zymomonas mobile* en milieu au pantothénate et les fioles n^{os} 7 à 18 étaient mesurées immédiatement dans le biophotomètre, alors que les autres étaient disposées pendant 12 heures à l'étuve à 27 °C.

Les trois mesures biophotométriques, comportant chaque fois six fioles, nous ont permis de constater qu'il ne se manifestait aucun développement, sauf dans les fioles n^{os} 9 et 10, puis dans les n^{os} 17 et 18.

Nous avons de nouveau employé 1 ml de chaque extrait restant pour effectuer une chromatographie en couche mince, sans migration, en employant successivement comme révélateur :

- 1° La ninhydrine ;
- 2° La phloroglucine + acide phosphorique ;
- 3° Le réactif de Van URK ;
- 4° La solution alcoolique d'acide sulfurique ;
- 5° Le réactif universel au permanganate de potasse.

Les cinq chromatographies devaient donc nous permettre de séparer les amino-acides, les glucides, les dérivés indoliques, les gibberellines et les autres substances éventuellement présentes. Nous exprimons dans le tableau suivant les résultats obtenus :

TABLEAU N° 16

Mise en évidence des différents facteurs de croissance
avec les réactifs suivants :

Fiole n°	Révélateur n°				
	1	2	3	4	5
1	++	+	0	0	+
2	++	+	0	0	+
3	+	+	0	0	+
4	+	+	0	0	+
5	0	+	0	0	+
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	+
9	0	0	0	0	+
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
17	0	0	+	+	+
18	0	0	+	+	+

Révélateur n° 1 = ninhydrine ; n° 2 = phloroglucine + acide phosphorique ; n° 3 = réactif de Van URK ; n° 4 = solution alcoolique d'acide sulfurique ; n° 5 = réactif universel au permanganate de potasse.

On peut conclure de ces résultats que le produit X a migré avec le solvant, tandis que l'acide gibberellique et l'acide indol- β -acétique ont été adsorbés sur le *Florisil*. D'autre part, on remarque que l'activité biogène est uniquement due aux trois composants : acide gibberellique, acide indol- β -acétique et au produit X, tandis que les premières fractions, formées par les amino-acides et les sucres, n'ont aucune action stimulante sur le développement de *Zymomonas mobile*.

Etude comparative de l'activité de la substance X par rapport aux autres facteurs biogènes isolés

Comme il ressort de nos expériences précédentes, le produit X, de constitution inconnue, présente l'activité biogène optimale. Pour contrôler cette observation par rapport à l'activité de l'acide gibberellique et des dérivés indoliques, nous avons effectué l'expérience biophotométrique suivante :

Les six fioles reçoivent d'abord 1 ml de milieu au pantothénate à double concentration, puis respectivement :

Fiole n° 1 : 2 ml de la fraction de l'acide β -indol-acétique + 2 ml d'eau distillée stérile.

Fiole n° 2 : 2 ml de la fraction d'acide gibberellique + 2 ml d'eau distillée stérile.

Fiole n° 3 : 2 ml de la fraction contenant la substance X + 2 ml d'eau distillée stérile.

Fiole n° 4 : 1,3 ml de la fraction d'acide gibberellique + 1,3 ml de la fraction indolique + 1,3 ml de la fraction de produit X.

Fiole n° 5 : 2 ml de la fraction d'acide gibberellique + 2 ml de la fraction indolique.

Fiole n° 6 : 4 ml de Biostimuline naturelle.

Chaque fiole contient donc sensiblement 8 ml de mélange réactionnel ; on ensemence au moyen de 20 gouttes d'une deuxième subculture en milieu au pantothénate de *Zymomonas mobile*. Nous avons employé intentionnellement 20 gouttes dans ces expériences pour obtenir un amorcement de la croissance plus rapide. Les fioles sont disposées à l'étuve à 27 °C pendant 15 heures, puis on effectue la mesure biophotométrique pendant 15 nouvelles heures.

Interprétation

La technique employée nous a permis de constater dès le début de la mesure biophotométrique une nette différenciation des courbes de croissance. On remarque que l'acide β -indol-acétique et l'acide gibberellique seuls ou mélangés possèdent une certaine activité biogène, mais beaucoup moins importante que celle de la substance X, qui semble être le facteur essentiel de l'activité biogène (courbes n°s 3, 4 et 6).

On constate que l'amorcement de croissance de *Zymomonas* est optimal en présence de la Biostimuline pure. Cependant, après 9 heures d'enregistrement au biophotomètre, la courbe correspondant au mélange des trois facteurs actifs rejoint la courbe n° 6. La courbe n° 3 correspondant à la substance X seule, accuse un léger retard par rapport aux courbes n°s 4 et 6 et qu'elle rejoint après 14 à 15 heures (voir fig. n° 14).

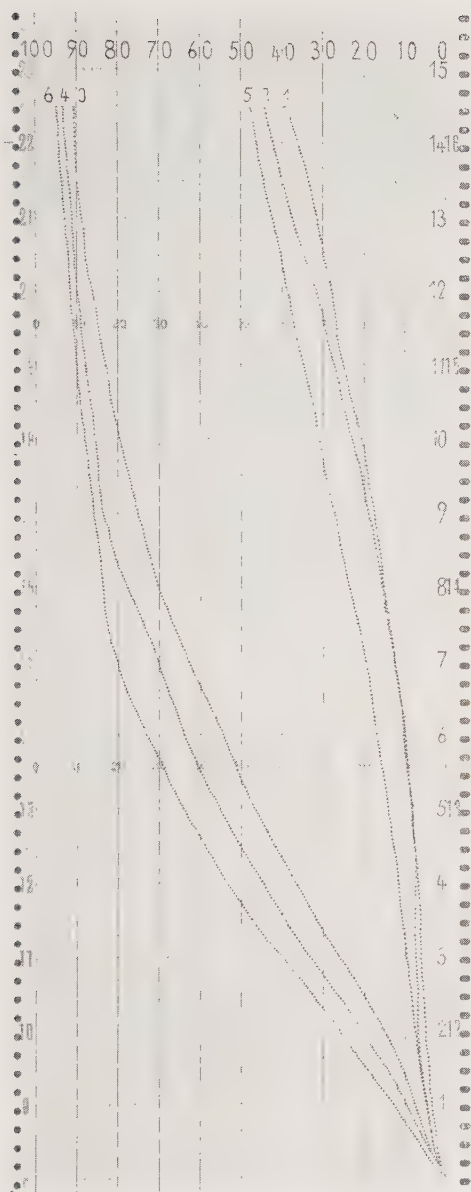


Fig. n° 14. — Courbes biophotométriques
de l'activité des trois produits biogènes
chimiquement définis mis à l'épreuve

Etude de l'influence de la concentration en substance X sur la croissance de *Zymomonas mobile*

Cette expérience a encore été effectuée au biophotomètre, en introduisant dans les six fioles 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration, puis des doses croissantes de *substance X*, isolée antérieurement dans nos expériences de chromatographie en colonne. Nous avons déjà constaté que, parmi les 30 fractions isolées, celles portant les n^{os} 19 et 20 étaient les plus actives. Nous avons donc préparé notre série de fioles comme suit :

TABLEAU N^o 17

Etablissement de la gamme de dilution de la substance X employée

Fiole n ^o	Fraction n ^{os} 19+20 en ml	Eau distillée en ml
1	4,0	0,0
2	3,0	1,0
3	2,0	2,0
4	1,5	2,5
5	1,0	3,0
6	0,5	3,5

Les mélanges réactionnels ainsi constitués étaientensemencés avec 20 gouttes d'une deuxième subculture de *Zymomonas* en milieu au pantothénate, puis les six fioles étaient déposées pendant 15 heures à l'étuve à 27 °C. La mesure biophotométrique était effectuée pendant 8 heures.

Etant donné que dès le début de la mesure biophotométrique on notait déjà des variations dans la croissance, nous pouvions raccourcir le temps d'expérience. Les résultats graphiques enregistrés montraient que des concentrations trop fortes (4 ml et 3 ml : courbes n^{os} 1 et 2) *avaient plutôt une action frénatrice sur le développement de Zymomonas*, qui semble interrompu à partir de la cinquième heure de la mesure. *Des concentrations plus faibles*, par contre, favorisaient l'amorçage et le développement de *Zymomonas*. La dose optimale d'activité biogène était de 1,5 ml de la fraction de *substance X* (voir fig. 15 ci-contre).

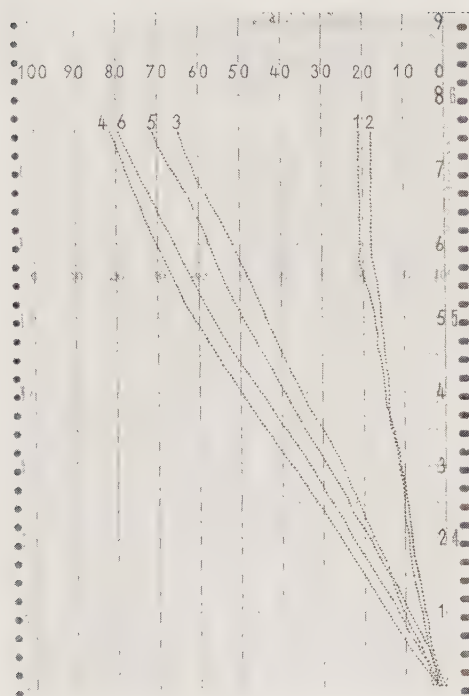


Fig. n° 15. — Courbes biophotométriques de différentes dilutions de la substance X

CHAPITRE VIII

ESSAI D'IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE X

Dans le but d'isoler et d'identifier la *substance X*, nous avons employé des doses plus importantes de *Biostimuline végétale liquide et solide*. A ce sujet, nous avons utilisé 50 ml de *Biostimuline liquide* que nous avons concentrés, comme nous l'avons décrit dans notre expérience de chromatographie en colonne. Le concentrat est trituré avec 5 g de *Florisil* pour obtenir une pâte homogène que l'on déshydrate et pulvérise. Cette poudre est ensuite utilisée pour pratiquer une chromatographie en colonne.

Quant aux *Biostimulines solides*, elle ne nécessitent pas l'adjonction d'un excipient, et on les dispose directement sur la colonne de *Florisil*, après les avoir finement pulvérisées. Le protocole expérimental est identique à celui des essais antérieurs. Ainsi, nous avons employé comme solvant de migration le mélange :

Benzène	70 g
Butanol	25 g
Acide acétique cristallisé	5 g

Pour chaque chromatographie, on employait 150 ml de ce mélange. Ce réactif nous semblait particulièrement indiqué, étant donné que les *Biostimulines solides* renferment comme *substance de ballast du lactose* qui ne migre pas dans ce solvant. Une expérience précédente nous avait en effet montré que le solvant :

Isopropanol	90 g
Eau distillée	5 g
Ammoniaque	5 g

transforme les *Biostimulines solides* en une sorte de pâte due à la solubilisation partielle du lactose. Dans ces conditions, le front de migration dans l'*adsorbant Florisil* devient imprécis et la migration même est nettement freinée. D'autre part, le *lactose* partiellement solubilisé se retrouve localisé dans l'ensemble de la colonne et masque ainsi toutes les autres substances.

Pour chaque chromatogramme, nous avons récolté 12 fractions de 7 ml grâce au collecteur automatique. Nous avons effectué quatre expériences parallèles, dont trois à l'aide de 20 g de *Biostimuline solide* et une avec 50 ml de *Biostimuline liquide*. On dépose 2 gouttes de chacune des 48 fractions recueillies sur une plaque de chromatographie en couche mince

(*Silicogel G activité de Merck*), on effectue la chromatographie, on sèche rapidement à l'étude à 100 °C, on laisse refroidir à 50 °C et on vaporise immédiatement le réactif universel au permanganate.

A la lecture du chromatogramme, on note la présence de la *substance X* par l'apparition de taches blanches sur fond violet. Dans les quatre séries, les concentrations les plus marquées se trouvaient dans les fioles n^{os} 9 à 12 avec un maximum pour les fioles n^{os} 10 et 11. *Ces fractions à activité biogène* ont été réunies et évaporées à siccité dans l'appareil rotatif sous vide. Le résidu fut repris dans un minimum d'alcool et la solution alcoolique était à nouveau évaporée pour éliminer toute trace de solvant Benzène + Butanol + Acide acétique. Finalement, nous avons repris le résidu dans de l'alcool à 20 %. Les solutions ainsi obtenues présentent une légère teinte jaunâtre que nous avons éliminée au moyen de charbon actif, en chauffant jusqu'à ébullition sur un bain-marie électrique. On filtre pour éliminer le charbon et on obtient un filtrat limpide, incolore, qui renferme la *substance X*. Pour contrôler ce fait, nous avons effectué des *chromatogrammes en couche mince* au moyen de trois révélateurs spécifiques de :

- 1° L'*acide gibberellique* (H₂SO₄ + alcool) ;
- 2° Des *dérivés indoliques* (réactif de Van URK) ;
- 3° De la *substance X* (réactif universel au permanganate).

TABLEAU N° 18
*Caractérisation des trois substances biogènes
à l'aide des réactifs spécifiques*

Faction n°	REVELEATEUR		
	H ₂ SO ₄ + alcool	Réactif de Van Urk	Réactif universel au permanganate
1	—	—	—
2	—	—	—
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	+
10	—	—	++
11	—	—	++
12	—	—	+

Comme on le voit, le filtrat en expérience est dépourvu de dérivés gibberelliques et indoliques. Nous avons effectué une deuxième filtration sur charbon actif pour obtenir un filtrat dépourvu de toute substance hétérogène ; celui-ci est évaporé de 10 ml à 2 ml dans l'appareil rotatif sous vide, le résidu est introduit dans un petit vase de précipitation et disposé dans le

congélateur. Après 30 minutes environ, nous avons obtenu un dépôt de cristaux blancs, sur lesquels nous avons pratiqué une analyse élémentaire qui a donné les résultats suivants :

$$\begin{aligned} \text{C} &= 56,0 \% ; \\ \text{H} &= 4,5 \% ; \\ \text{N} &= 32,5 \% ; \\ \text{O} &= 7,0 \%. \end{aligned}$$

Comme on le voit, il s'agit d'un produit strictement organique. Pour déterminer sa structure chimique plus détaillée, nous avons rencontré beaucoup de difficultés, car les réactions caractéristiques n'étaient jamais concordantes. Pour éclaircir ce problème, des analyses complémentaires plus poussées seront nécessaires.

Pour essayer d'élucider cette question, nous avons procédé à de *nouveaux essais chromatographiques en couche mince*, en employant différents solvants. C'est ainsi que nous avons tenté de mettre en évidence l'existence de produits des *groupes alcaloïdes, des stéroïdes et des glucides*.

Nous avons préparé des plaques de *Silicogel G Merck* qui ont été activées par un chauffage à 120 °C pendant 20 minutes. Ensuite, nous y avons déposé les fractions concentrées isolées antérieurement par la chromatographie en colonne et contenant la *substance X*. La distance de migration était de 10 cm.

Premier essai

Le solvant migrateur était constitué par le mélange benzène + butanol + acide acétique. Après séchage comme d'habitude, le chromatogramme était révélé au moyen d'un réactif universel au permanganate sulfurique, ce qui faisait apparaître une tache brun clair sur fond violet. Par la lecture aux rayons UV, la tache paraît rose brunâtre et le R_f est de 58. Le chauffage à 100 °C pendant 10 minutes fait disparaître la teinte violette. On laisse refroidir le chromatogramme et on y vaporise le *révélateur à l'acide sulfochromique* (solution saturée de dichromate de potasse dans l'acide sulfurique concentré). En examinant la plaque dans les rayons UV, la tache réapparaît avec une fluorescence bleue claire. Cette tache unique laisse croire qu'il s'agit d'un seul composant.

Deuxième essai

Le solvant de migration est de nouveau le mélange benzène + butanol + acide acétique. Après son évaporation, nous avons employé différents réactifs qui devaient éventuellement nous permettre de classer notre produit.

Réactif au trichlorure d'antimoine chloroformique

On dissout 25 g de trichlorure d'antimoine dans 75 g de chloroforme exempt d'alcool par filtration sur une colonne d'oxyde d'alumine activé. Après vaporisation, on expose le chromatogramme pendant 10 minutes à

100 °C, puis on passe à l'examen aux rayons UV. L'apparition de taches fluorescentes signifierait la présence de *corps carotinoïdes, terpéniques, stéroïdes ou phénoliques*. Dans ces conditions, la réaction est restée négative.

Réactif de Dragendorff modifié par Munier

Ce réactif est classique pour la recherche des *alcaloïdes*. Il est préparé d'après LEBEAU et JANOT (35). La plaque en est vaporisée, puis on sèche à 105 °C pendant 5 minutes. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif des taches de couleurs différentes et spécifiques. Ici aussi, la réaction est restée négative, prouvant l'absence d'alcoïdes dans notre substance X.

Réactif de Van Urk

Ce réactif est spécifique pour les *alcaloïdes indoliques et pour tous les dérivés d'indole* en général. Pour sa préparation, on mélange :

Acide chlorhydrique à 25 %	50 ml
Alcool à 96°	50 ml

puis on y ajoute :

p-diméthylaminobenzaldéhyde	1 g
-----------------------------------	-----

Ce révélateur est vaporisé sur le chromatogramme, puis on le dispose pendant 20 minutes à 50 °C. Finalement, on fait passer des vapeurs d'eau régale sur la plaque, ce qui devrait faire apparaître des *taches chromatographiques en présence de dérivés indoliques*. Notre expérience est restée négative.

Réactif à la ninhydrine + butanol + acide acétique cristallisable

Le chromatogramme traité par ce réactif était négatif, ce qui prouve l'absence de composants d'amines ou d'amino-acides.

Réactif phospho-molybdique à l'éthanol-éther

On prépare une solution à 5 % d'acide phosphomolybdique dans un mélange à parties égales d'éther et d'éthanol. Ce révélateur est vaporisé sur le chromatogramme, qui est ensuite exposé pendant 5 minutes à 100 °C ; il est spécifique pour l'*acide gallique et ses dérivés* et donne des taches bleues sur fond jaune. Ici encore, nous avons enregistré un résultat négatif.

Réactif phloroglucine + acide orthophosphorique

Nous avons donné antérieurement la composition de ce réactif spécifique des *sucres* en donnant des taches de teintes différentes. Le chromatogramme est séché pendant 10 minutes à 105 °C après vaporisation. Dans notre cas, aucune tache n'est apparue.

Examen aux rayons UV

On dépose le filtrat sur la plaque chromatographique, on laisse sécher et on observe aux rayons UV. Le résultat est négatif, en examinant le dépôt de substance sur place et après migration.

De l'ensemble de ces recherches d'identification, nous pouvons conclure que *seul le réactif universel au permanganate de potasse + acide sulfurique concentré*, peut être employé comme réactif révélateur de la substance X. D'autre part, nous avons vu que *cette substance X* ne fait partie d'aucun des groupes de produits recherchés.

Nous avons ensuite essayé de caractériser notre produit par détermination des valeurs Rf dans différents solvants de migration.

Dans le solvant benzène + butanol + acide acétique concentré, le Rf est de 58. Dans l'isopropanol + ammoniacque + eau, il est de 89. Dans le butanol saturé d'eau, il est de 76. Dans une solution d'éthanol 10 g + eau 90 g, le Rf est de 81. Dans une solution d'éthanol 90 g + eau 10 g, il est de 55.

Dans la littérature spécialisée il ne nous a pas été possible de trouver mention d'un produit présentant des valeurs de Rf analogues dans les mêmes conditions.

Pour pousser plus avant nos investigations, nous avons soumis notre substance X à une hydrolyse. On introduit dans un tube en verre fusible 2,5 ml de la fraction active isolée par chromatographie en colonne, puis 7 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 10 %. On soude le tube et on l'expose pendant 18 heures à 100 °C. On laisse ensuite refroidir et on obtient un liquide légèrement jaunâtre que l'on évapore à siccité dans l'appareil rotatif sous vide. Le résidu est disposé pendant 2 heures dans une cloche à vide sous lessive de soude en paillettes, ceci pour neutraliser l'acide chlorhydrique en excès. Le résidu ainsi traité est dissous dans 2,5 ml d'une solution d'alcool à 50 %. Cette solution est employée pour la chromatographie en couche mince. Chaque plaque de *Silicogel* est chargée de 10 µl de la solution en expérience, puis on fait migrer respectivement avec :

- Le réactif benzène + butanol + acide acétique ;
- L'isopropanol + ammoniacque + eau ;
- Le butanol saturé d'eau ;
- La solution de phénol dans l'eau (75 g/25 g).

En révélant ces différentes plaques au moyen du *réactif universel au permanganate de potasse*, nous n'avons pu constater qu'une tache blanchâtre assez faible sur fond violet, située à l'endroit du dépôt de la solution en expérience, ce qui indique que la substance X n'a pas migré dans ces solvants et démontre que le procédé d'hydrolyse a modifié ou décomposé *notre substance X* d'une façon que nous n'avons pas pu contrôler.

Contrôle biophotométrique

Le reste de notre solution a été utilisé pour des expériences *au biophotomètre* et pour contrôler éventuellement son activité biogène après hydrolyse. Cette solution est à un taux alcoolique trop élevé (50 %) pour le développement du *Zymomonas*. Nous l'avons donc évaporé dans le vide et repris le résidu avec une solution d'alcool à 10 % (2 ml). Les six fioles du biophotomètre étaient chargées de la façon suivante :

FIOLE N° 1 : 2 ml de la solution alcoolique ci-dessus + 2 ml d'eau distillée stérile + 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration.

FIOLE N° 2 : Trois plaques chromatographiques chargées de notre substance X sont divisées en carrés de 2 cm $\times$ 2 cm au niveau de la ligne de dépôt. On recueille le Silicogel correspondant raclé au moyen d'une petite spatule et les fractions correspondantes sont réunies et introduites dans un petit tube, puis dissous dans 5 ml d'une solution alcoolique à 50 %. On agite de temps en temps pendant 12 heures, puis on centrifuge, on décante le liquide surnageant chaque fois sur un filtre et les filtrats alcooliques recueillis sont évaporés et repris avec 2 ml d'une solution d'alcool à 10 %. Ces 2 ml sont introduits dans la fiole n° 2 + 2 ml d'eau distillée + 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration.

FIOLE N° 3 : Elle est remplie de la même façon, mais contient la raclure du deuxième carré de chromatogramme, comme indiqué ci-dessus.

FIOLES N° 4 et 5 : Elles sont remplies de la même façon avec les raclures provenant respectivement des carrés 3 et 4.

FIOLE N° 6 : 4 ml de milieu au pantothénate à double concentration + 4 ml d'eau distillée.

Après stérilisation, on ensemence au moyen de 20 gouttes d'une deuxième subculture de *Zymomonas* en milieu au pantothénate. On dispose à l'étuve à 27 °C pendant 12 heures et on passe à la biophotométrie. Nous avons intentionnellement employé des doses d'inoculat fortes pour révéler plus aisément l'éventuelle présence de *Biostimulines*.

Après 15 heures de mesure, nous n'avons pu constater aucun amorcement de croissance dans les six fioles, ce qui prouve que la substance X hydrolysée ne contient plus de facteur biogène, à l'inverse de la substance non hydrolysée.

Détermination de la concentration optimale d'acide gibberellique par rapport à la croissance de *Zymomonas mobile*

Une première expérience a été effectuée par la méthode gazométrique, à l'aide des tubes de Besson modifiés et de solutions dans l'alcool d'acide gibberellique pur à doses croissantes, introduites dans le milieu au pantothénate et ensemencées avec le *Zymomonas mobile* comme d'habitude. Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU N° 19

*Mesure de l'activité biogène de l'acide gibberellique
sur le Zymomonas mobile par gazométrie*

Concentration en ac. gibberellique	0,00001 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %
Croissance	+	+++	++	+	±

Nous avons contrôlé cette expérience par une mesure biophotométrique, en chargeant les six fioles de la façon suivante :

TABLEAU N° 20

*Mesure biophotométrique de l'activité biogène de l'acide gibberellique
sur le Zymomonas mobile*

Fiole n°	Concentration en acide gibberellique	Croissance
1	0,00005 %	++
2	0,000075 %	+++
3	0,0001 %	++++
4	0,00025 %	+++
5	0,0005 %	++
6	0,00075 %	++

Les deux essais ont donné un résultat concordant en indiquant que la dose optimale d'acide gibberellique se situe aux environs de 0,0001 %, mais l'activité biogène est beaucoup plus faible qu'en présence de notre substance X.

Détermination de la concentration optimale d'acide indol- β -acétique par rapport à la croissance de Zymomonas mobile

Comme dans l'essai précédent, nous avons examiné l'activité biogène due à la seule présence de l'acide indol- β -acétique. Nous avons encore fait un essai gazométrique et une mesure biophotométrique avec les résultats suivants :

TABLEAU N° 21

*Mesure gazométrique de l'activité biogène de l'acide indol- β -acétique
sur le Zymomonas mobile*

Concentration en acide indol- β -acétique	0,00001 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %
Croissance	+	+++	+++	++	±

TABLEAU N° 22

*Mesure biophotométrique de l'activité biogène de l'acide indol- β -acétique sur le *Zymomonas mobile**

Fiole n°	Concentration en acide indol- β -acétique	Croissance
1	0,0001 %	$\pm$
2	0,00025 %	+
3	0,00050 %	+++
4	0,00075 %	++++
5	0,0010 %	++
6	0,0025 %	+

Il ressort de ces deux essais que la *dose optimale d'activité biogène de l'acide indol- β -acétique* se situe de part et d'autre d'une concentration de 0,00075 %, mais elle est toujours *de beaucoup inférieure à celle de notre substance X*, puisque la courbe optimale n° 4 s'inscrit après 15 heures d'enregistrement à 25 mAmp.

Détermination de la structure moléculaire de notre substance biogène X

Nous avons essayé de cristalliser *cette troisième substance biogène* caractérisée par ses propriétés biologiques. A cet effet, nous avons préparé un extrait alcoolique qui a été concentré à une température de 70 °C, puis déposé au réfrigérateur. Nous avons ainsi obtenu, après 24 heures, un dépôt qui a été séparé par centrifugation du solvant alcoolique. Ce précipité a été repris par de l'alcool à 95°. La nouvelle solution a été filtrée sur un filtre de Iéna et le résidu resté sur le filtre a été repris avec de l'alcool à 95°. La solution obtenue a été concentrée avec les précautions d'usage, à 70 °C, puis le concentrat était déposé au réfrigérateur pour obtenir une vraie cristallisation. Les cristaux ainsi obtenus ont été séparés du solvant par centrifugation, puis desséchés à la température de 50 °C dans le vide.

Détermination du point de fusion de la substance X

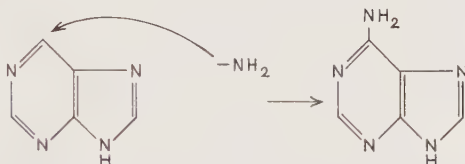
Nous avons tenu à déterminer *le point de fusion de notre substance biogène X cristallisée*. Il était important pour nous d'établir si ces cristaux correspondaient effectivement aux caractères inhérents *aux Biostimulines*. En effet, on sait que celles-ci sont très thermostables et supportent sans inconvénient une stérilisation à 120 °C pendant 20 à 30 minutes. Le point de fusion doit donc forcément être supérieur à cette température. Nous avons ainsi pu déterminer au moyen des techniques habituelles (banc de Kofler) et par la méthode au tube capillaire (voir Codex 1965, p. 1503) que nos cristaux bruts avaient un point de fusion de 210 °C ($\pm$ 5 °C) ce qui corroborait nos observations quant aux propriétés physiques *des Bio-*

stimulines et les résultats biologiques sur la stimulation de la croissance du *Zymomonas mobile*.

Identification chimique de la substance isolée :

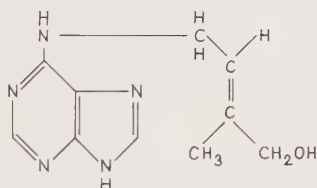
L'examen chimique de nos cristaux a été effectuée par le *Service de Chimie organique* du « *Polytechnikum* » de Zurich, que nous remercions ici.

La structure chimique de la substance X a montré qu'il s'agit d'un *dérivé purine* possédant en position 6 un groupe aminé. La formule de base correspond à la structure suivante :



Le groupe aminé en position 6 est substitué par une chaîne de C formée de 5 atomes de C et ayant une double liaison.

La formule correspond probablement à un corps : 6-4-hydroxy-3-méthyl-but-trans-2-ényl-aminopurine, qui peut être représenté par la formule développée :



Nous faisons cependant remarquer que la constitution de la chaîne latérale de cette formule n'est pas à considérer comme indubitable. La substance X présente un radical très voisin de celui de l'*Adénine* (6-aminopurine) et de l'*Hypoxanthine*, ce qui pourrait expliquer son effet biogène à petites doses et peut-être son *activité cytostatique* en fortes concentrations par un effet compétitif.

Afin de pousser plus avant l'étude de la constitution de ce corps, nous avons procédé à plusieurs recristallisations. Nous avons ainsi pu déterminer les caractéristiques suivantes :

- Point de fusion : 261 à 263 °C ;
- Formule : $C_{10}H_{12}N_5O$;
- Poids moléculaire : 218.

Ces valeurs viennent confirmer l'exactitude de la formule développée proposée ci-dessus.

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail a trait à l'étude des extraits biogènes préparés d'après la technique de FILATOV à partir de germes de céréales. C'est pour cette raison que nous avons tenu, dans notre historique, à exposer nos connaissances actuelles sur ces *Biostimulines* et sur leurs méthodes de dosage. Nous indiquons brièvement l'emploi des *Biostimulines* d'origine animale, donc des extraits placentaires, dans la thérapie actuelle ainsi que leurs propriétés biologiques.

Au cours de nos expériences, nous avons caractérisé l'activité biogène de nos extraits végétaux en ayant recours à une bactérie-test spécifique, le *Zymomonas mobile* Lindner, utilisé pour la première fois par BURLET MEYER et FAUDI, qui ont prouvé que la croissance de ce germe est en rapport direct avec le taux de *Biostimulines* présent dans le substrat nutritif. Nous aurons l'occasion, au cours de nos expériences, de faire quelques réserves quant à cette définition.

Les mesures de croissance ont été effectuées par voie gazométrique au moyen du tube de Besson modifié et gradué (méthode de FAUDI) et par le biophotomètre de Bonet-Maury (méthode de ILLIEN). Nous donnons donc, dans notre historique, les détails de ces deux méthodes.

Dans nos travaux d'isolement et de caractérisation du facteur biogène actif, nous avons principalement eu recours à la chromatographie et à l'électrophorèse. C'est pour cette raison que nous exposons dans le Chapitre II les généralités sur les techniques chromatographiques sur papier ou en couche mince. Quant à la chromatographie en colonne et aux techniques électrophorétiques, nous les exposons au cours de nos travaux personnels.

La deuxième partie de notre exposé est réservée aux *Travaux Personnels*. Dans le Chapitre III, nous décrivons les milieux de culture auxquels nous avons fait appel, puis nous relatons nos essais préliminaires en ce qui concerne le choix des bactéries-test susceptibles de servir au dosage de l'activité biogène de nos préparations. Nous avons travaillé avec les *Biostimulines* liquides et avec d'autres, lyophilisées, avec comme support du lactose. Ces produits ont été tout d'abord caractérisés par spectrophotométrie et chromatographie sur papier et en couche mince monodimensionnelle.

L'isolement des facteurs biogènes dans nos extraits végétaux a été tenté par électrophorèse et chromatographie en mettant en œuvre différents solvants de migration. Ces techniques nous ont permis de révéler la pré-

sence d'acides aminés au nombre de 10, dont l'identification ultérieure a prouvé qu'il s'agissait de : *tryptophane, leucine, valine, histidine, acide glutamique, glycocolle, proline, β -alanine, acide aspartique et arginine*. D'autre part, nous avons pu caractériser les glucides présents dans nos extraits biogènes.

Par la suite, nos investigations se sont portées vers la mise en évidence éventuelle d'autres dérivés protidiques et peptidiques, avec un résultat négatif. Au cours de ces recherches, nous avons pu mettre en évidence des dérivés indoliques ; il s'agit de l'acide *indol- β -acétique* et d'un autre facteur biogène extrait récemment à partir d'extraits de germes de maïs et d'autres céréales par Van OVERBEEK et PILET : l'*acide gibberellique* ou *gibberelline A3*.

Nous avons ensuite entrepris de fractionner notre électrophorégramme dans le but de situer les différents composants à activité biogène, ce qui nous a permis de localiser avec précision l'acide indol- β -acétique et l'acide gibberellique ainsi qu'une troisième fraction inconnue, mais à activité optimale.

En divisant les chromatogrammes en couche mince en 11 fractions, nous avons pu caractériser les zones d'activité biogène par la méthode biophotométrique. Ces diverses méthodes nous ayant permis de mettre en évidence la présence des acides aminés, de l'acide gibberellique et de l'acide indol- β -acétique ainsi que d'une substance biogène inconnue, nous avons eu recours à la chromatographie en colonne pour étudier comparativement l'activité de cette *substance X* par rapport aux autres facteurs biogènes isolés. Ces travaux nous ont amené à contrôler l'influence de doses croissantes de substance X, d'acide gibberellique et d'acide indol-3-acétique sur la croissance du *Zymomonas mobile*. A ce sujet, nous avons constaté que ces facteurs de croissance se caractérisent par une propriété biologique spécifique : leur activité évolue selon une courbe ascendante commençant par des doses très faibles, atteignant son optimum, puis descendant à mesure que les concentrations deviennent trop fortes. Les Biostimulines ont donc la propriété d'agir comme biocatalyseurs de croissance à doses relativement faibles, puis comme frénateurs.

Quant à la substance X, nous avons pu déterminer sa composition élémentaire qui est de :

C	=	56,0 %
H	=	4,5 %
N	=	32,5 %
O	=	7,0 %

Cette substance se différencie donc des principaux facteurs de croissance végétaux généralement isolés tant par sa composition établie par l'analyse élémentaire que par ses propriétés analytiques et son pouvoir biogène, comme cela ressort de la détermination du point de fusion, des analyses chromatographiques, électrophorétiques et biophotométriques. Il semble que

cette substance X soit le facteur essentiel de l'activité de nos Biostimulines végétales. Elle se rapproche de par sa constitution chimique de l'Adénine et de l'Hypoxanthine, donc des bases du groupe purique possédant en plus une chaîne latérale formée de cinq atomes de carbone avec une liaison éthylénique, dont nous n'avons pas encore pu élucider avec certitude la structure définitive.

Ceci nous incite à poursuivre l'étude de ce produit, quant à sa formule développée de constitution et à l'application de ses propriétés biologiques à la thérapeutique humaine, à l'industrie et à l'agriculture. En tout état de cause, cette substance X ne peut pas rentrer dans le groupe des vitamines, des hormones ou des enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

- (4) BISCHOFF M. — Ophtalmologika, 1952, N° 2, suppl.
- (2) BOROS B., MEHES G. et ARATO M. — Klin. Monatsbl. Augenheilkunde, 1951, 118, 308.
- (16) BOYD, MARINSKY et SPEDDING. — Journ. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 2781-86.
- (33) BRIAN P. W., GROWE J. F. et Mac MILLAN. — The Gibberellins : L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chem. org. Naturstoffe, Springer, Vienne, 1960, Vol. 18, p. 350.
- (23) CAMAG. — Chemie Erzeugnisse und Adsorptionstechnik A.-G., Homburgerstr. 24, CH 4132, Muttenz (Suisse).
- (20) CONSDEN, GORDON et MARTIN. — Biochem. Journ. 1947, 41, 590 ; 1946, 40, 580.
- (27) CRAMER F. — Papierchromatographie, Verlag Chemie Weinheim, 1953, p. 51.
- (19) DAKIN D. — Journ. Biol. Chem., 1913, 15, 127.
- (12) DURRER P. — *Influence de l'acide pantothénique sur le complément et les anticorps spécifiques*. A propos de la vaccination tétanique et T. A. B. Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1959.
- (8) ENTNER et DOUDOROFF. — Journ. Biol. Chem. 1952, 196, 853.
- (13) FAUDI J. G. — *Etude biologique et thérapeutique d'une Biostimuline d'origine végétale (Stimuline biogène selon FILATOV)*. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1957.
- (1) GATE J. et VACHER R. — *La thérapeutique tissulaire*. Encyclopédie Médico Chirurg. Masson, Paris, 1952, fasc. 12, 120 B 10.
- (22) GEHRIG Th. — *Les Trichophytines et leur constitution protéinique*. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1952.
- (6) GIBBS et DEMOSS. — Journ. Biol. Chem., 1954, 207, 689.
- (14) GOPPELSROEDER. — *Analyse capillarimétrique*. Poggendorff's Annalen, 1863, 61 ; Chem. Zentralblatt, 1856, 802.
- (9) ILLIEN R. — *Contrôle et standardisation d'extraits biogènes d'origine animale*. Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1961.
- (30) KUROSAWA E. — Trans. Nat. Histol. Soc., Formosa, 1926, 16, 213.
- (35) LEBEAU P. et JANOT M. M. — *Traité de Pharmacie Chimique*, Masson, Paris, 1955, p. 2695.
- (15) LEDERER E. — Bull. Soc. Chim. de France, 1939, 6, 897-929.
- (5) LINDNER P. — Atlas mikro. Grundl. Gährungskunde, Leipzig, 1928, 3^e édition, Vol. 2, Tabl. 68.
- (21) MARTIN et SYNGE. — Biochem. Journ., 1941, 35, 1358.
- (3) MOGINIER. — Ophtalmologika, 1949, N° 4, suppl.
- (7) NICOL M. — Production of Ethanol by Agencies other than Yeast ; Brewer's Guild Journ., 1950, p. 354.

- (28) VAN OVERBEEK. — Science, Progrès de la Nature, août 1957.
- (26) PHILIPPS D. M. — Nature, Londres, 1948, 161, 53.
- (29) PILET P. E. — Les Phythormones de croissance. Méthodes, chimie, biochimie, physiologie. Application pratique. Masson, Paris, 1961.
- (18) PRATT J. J. et AUCLAIR J.-L. — Science, 1948, 108, 213.
- (25) RANERATH K. — *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
- (11) ROMOND Ch., SARTORY R., MEYER J. et MALGRAS J. — *La mise en évidence de cils bactériens. Etude d'une méthode de coloration*. Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy, 1959, 75.
- (24) STAHL E. — *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Springer, Berlin, 1962.
- (34) STAHL E. — *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Springer, Berlin, 1967, 2^e édition.
- (32) STODOLA F. H. — Source Book on Gibberellins 1828-1957, Agricult. Res. Service U. S. A. dép. Agricult. 1958.
- (17) TISELIUS A., DRAKE B. et HAGDAHL. — Experimentia, 1947, 3, 21.
- (31) YABUTA T. et HAYASHI T. — Journ. Agric. Chem. Soc. Japan, 1939, 15, 257 et 403.
- (10) ZETTNOW. — Zeitschr. für Hygiene, 1928, 85, 17.

Vu, Nancy, le 13 décembre 1968

Le Président de thèse

J.-G. MARCHAL

Vu et approuvé :

Nancy, le 20 décembre 1968

Le Doyen de la Faculté

A. BERNANOSE

Vu et permis d'imprimer :

Le Doyen de la Faculté

A. BERNANOSE

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	IX
PREMIÈRE PARTIE	
HISTORIQUE	
CHAPITRE I	
BIOSTIMULINES ET EXTRAITS PLACENTAIRES	1
Propriétés biologiques des extraits placentaires de FILATOV	3
Bactérie test : <i>Zymomonas mobile</i> Lindner	4
Mesures biophotométriques	6
Mesure gazométrique au moyen du tube de BESSON modifié	9
CHAPITRE II	
GENERALITES SUR LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	17
La constitution chimique d'une substance par rapport à la chromatographie.	17
La chromatographie de partage sur papier	19
Choix du papier chromatographique	19
Choix des solvants	20
Choix du révélateur	21
Discussion théorique sur le processus chromatographique	22
Chromatographie en couche mince	24
DEUXIÈME PARTIE	
TRAVAUX PERSONNELS	
CHAPITRE III	
ETUDE DES MILIEUX DE CULTURE ET ESSAIS PRELIMINAIRES ...	29
Essais préliminaires à l'aide de différentes bactéries-test	32
Essai de caractérisation des Biostimulines végétales	36
Détermination des doses limites d'activité des Biostimulines	37
Essais à l'aide de nouvelles préparations de Biostimulines	38
Expérience effectuée à l'aide d'une préparation de Biostimuline liquide.	46
Essais préliminaires de caractérisation des Biostimulines par spectrophotométrie et chromatographie	46

	Pages
CHAPITRE IV	
ESSAI D'ISOLEMENT DES FACTEURS BIOGENES DANS NOS EXTRAITS VEGETAUX.	51
Caractérisation des acides aminés par électrophorèse et chromatographie.	56
Recherche des substances biogènes glucidiques	58
Recherche des acides aminés	59
CHAPITRE V	
RECHERCHE DES DERIVES PROTIDIQUES, PEPTIDIQUES, GLUCIDIQUES ET INDOLIQUES DES BIOSTIMULINES	67
Recherche des dérivés glucidiques	67
Recherche des dérivés indoliques	69
Recherche d'autres facteurs biogènes	70
CHAPITRE VI	
ESSAIS BIOLOGIQUES DE CARACTERISATION DU FACTEUR BIOGENE ACTIF.	73
Nouvelle expérience au moyen d'une technique modifiée	76
Nouvelle expérience exécutée en cupule	76
Contrôle de l'activité biogène par le biophotomètre	77
CHAPITRE VII	
ESSAI DE CARACTERISATION DU FACTEUR BIOGENE ACTIF PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	81
Analyse biophotométrique	83
Recherche des sucres par chromatographie en couche mince	84
Recherche des acides aminés	84
Recherche des Biostimulines	84
Etude comparative de l'activité de la substance X par rapport aux autres facteurs biogènes isolés	88
Etude de l'influence de la concentration en substance X sur la croissance du <i>Zymomonas mobile</i>	90
CHAPITRE VIII	
ESSAI D'IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE X	93
Premier essai	95
Deuxième essai	95
Examen aux rayons UV	97
Contrôle biophotométrique	98
Détermination de la concentration optimale d'acide gibberellique par rapport à la croissance du <i>Zymomonas mobile</i>	98
Détermination de la concentration optimale d'acide indol-3-acétique par rapport à la croissance du <i>Zymomonas mobile</i>	100
Détermination de la structure moléculaire de notre substance biogène X	101
Détermination du point de fusion de la substance X	101
Identification chimique de la substance isolée	102
CONCLUSIONS GENERALES	103
BIBLIOGRAPHIE	107
PERMIS D'IMPRESSION	109

